UNIVERSITE d'ALGER

FACULTE DES SCIENCES

ANNEE 1962

N°

THÈSES

PRESENTEES POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES (ETAT)

PAR

Jacqueline LAJUDIE

1re THESE : CONTRIBUTION A L'ETUDE DES BACTERIES THERMOPHILES TELLURIQUES.

2e THESE : PROPOSITION DONNEE PAR LA FACULTE.

SOUTENUES PUBLIQUEMENT LE 15 NOVEMBRE 1962

DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN.

JURY

MM.	GARRIGUES	*Président*
	LEJEUNE	
	DIEUZEIDE	*Examinateurs*
	FABIANI	

UNIVERSITE d' ALGER

FACULTE DES SCIENCES

ANNEE 1962

N°

THÈSES

PRESENTEES POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES (ETAT)

PAR

Jacqueline LAJUDIE

****

1re THESE : CONTRIBUTION A L' ETUDE DES BACTERIES THERMOPHILES TELLURIQUES.

2e THESE : PROPOSITION DONNEE PAR LA FACULTE.

SOUTENUES PUBLIQUEMENT LE 15 NOVEMBRE 1962

DEVANT LA COMMISSION D' EXAMEN.

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

JURY

MM. GARRIGUES ..... *Président*

LEJEUNE .....

DIEUZEIDE ..... *Examinateurs*

FABIANI .....

U N I V E R S I T E d' A L G E R

-:-:-:-

FACULTE DES SCIENCES

-:-:-:-

Doyen	M. LAFFITTE

Professeurs

Analyse supérieure	M. BOURION
Astronomie et Astrophysique	M. MEYER
MATHEMATIQUES	M. FRAISSE
Mécanique rationnelle et appliquée	M.
Méthodes mathématiques de la Physique et Calcul des Probabilités	M. BOUIX
Chimie propédeutique	M. BACKES
Chimie générale	M. VUILLARD
Chimie appliquée	M. LEJEUNE
Physique	M. PERROT
Physique générale	M. COUCHET
Physique théorique	M. DUMONTET
Physique nucléaire	M. SUZOR
Physique expérimentale	M. SAVORNIN
Physique industrielle	M. CRAUSSE
Electronique	M. BARJON
Biologie générale et appliquée	M. HOLLANDE
Botanique générale et appliquée	M. QUEZEL
Botanique agricole et expérimentale	M. GARRIGUES
Géologie et Minéralogie	M. DELEAU
Géologie appliquée à l'Agriculture et à l'Industrie	M. LAFFITTE
Minéralogie et Cristallographie	M. CAPELLA
Zoologie générale	M. BERNARD

Professeurs titulaires à titre personnel

Biologie générale	M. DIEUZEIDE
Chimie générale	Mlle PEYTRAL
Géologie et Paléontologie	M. GOURINARD

Professeurs sans chaire

Botanique	M. NEGRE
Physique	M. SAVELLI
Tectonique et géologie profonde	M. GIRAUD
Physique industrielle	Mlle COUILLAUD
Génie chimique	M. POTIER

Maîtres de Conférences

Mathématiques M.P.C.	M.
Mathématiques M.G.P.	M.
Calcul différentiel et intégral	M.
T. M. P.	M. PICINBONO
Chimie	M. DESTRIAU
Chimie	
Physique M.G.P.	M. POIRIER
Physique M.P.C.	Mme SAVORNIN
Physique nucléaire	M.
Physique nucléaire	M. LAMBERT
Electronique	M. CACHON Pierre
Energie solaire	M. DAVID
Géologie	M. EMBERGER
Géologie	M. DEVRIES
Zoologie	Mme LECAL
Biologie générale	CACHON Jean
Physiologie générale	M. AMOURIQ
Botanique	M.

AVANT - PROPOS

Le travail que nous allons exposer a été effectué à l'Institut Pasteur, aussi nous tenons en premier lieu à exprimer notre respectueuse reconnaissance à Monsieur le Professeur TREFOUËL, Membre de l'Institut et de l'Académie de Médecine, Directeur de l'Institut Pasteur, qui nous a permis de mener à bien nos recherches.

Nous exprimons notre profonde gratitude à Monsieur le Professeur POCHON, Chef de Service à l'Institut Pasteur, qui nous a accueillie voici de longues années dans son service et qui a toujours dirigé nos travaux avec une autorité bienveillante.

Nous remercions également tous les collaborateurs du Service de Microbiologie du Sol et particulièrement le Docteur TARDIEUX, Chef de Laboratoire.

Nous remercions tout spécialement Monsieur le Professeur GARRIGUES qui a accepté la présidence de cette thèse. Qu'il trouve ici l'expression de notre gratitude pour nous avoir toujours réservé le meilleur accueil et n'avoir ménagé ni son temps ni ses conseils malgré les soucis qui l'assaillaient.

Nous remercions Monsieur le Professeur LEJEUNE et Monsieur le Professeur DIEUZEIDE qui ont bien voulu s'intéresser à notre travail et faire partie du jury.

A Monsieur le Professeur FABIANI, en particulier, nous exprimons notre profonde reconnaissance pour ses précieux conseils et sa bienveillante compréhension.

Qu'il nous soit permis d'adresser nos vifs remerciements à Monsieur le Professeur MANIGAULT et à son service de Photomicrographie pour l'aide qu'ils nous ont apportée dans la présentation de ce travail.

Que tous ceux qui nous ont aidée, à Paris comme à Alger, soient assurés de nos sentiments de reconnaissance.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES BACTÉRIES THERMOPHILES TELLURIQUES

INTRODUCTION

I N T R O D U C T I O N

En bactériologie, le groupe des micro-organismes thermophiles présente un intérêt tout spécial ; en effet, ces germes cultivent à des températures élevées qui ne correspondent pas aux conditions habituelles de la vie et ne permettent pas la multiplication des mésophiles ; à ces conditions extraordinaires sont liés, chez les thermophiles, des caractères biologiques parfois très particuliers.

Dans cette introduction, nous tenterons :

A- de définir ce que l'on entend par micro-organismes thermophiles ;

B- de classer ces germes ;

C- d'indiquer sommairement leur écologie générale ;

D- de rechercher leur origine ;

E- d'examiner la multitude des problèmes qu'ils posent tant au point de vue de leur biologie (multiplication et activité accélérées) qu'au point de vue de leur origine et de leur maintien à la surface de la terre où les conditions optimales de vie ne sont pas réalisées pour eux, de rappeler enfin leur rôle dans l'industrie des conserves, dans les composts, et dans l'auto-échauffement des tas de foin, des amas de grains

ou de végétaux.

A- Définition -

Les thermophiles se définissent comme des germes cultivant à des températures élevées. Cette définition n'est pas aussi simple qu'il le paraît car les auteurs ne sont pas d'accord entre eux du fait qu'ils n'adoptent pas la même température de culture ; c'est ainsi que pour NEGRE (1913) les thermophiles stricts sont des micro-organismes dont la température minimum de culture est supérieure à 40-42° C ; MICHOUSTINE (1950) estime que la température favorable de culture de ces germes se situe entre 50 et 60°. D'autres auteurs montent jusqu'à 75°.

La définition des thermophiles présente donc en elle-même une première difficulté.

B- Classification -

Les premiers germes thermophiles mis en évidence par MIQUEL (1879) et GLOBIG (1888) ont été isolés à partir de terre de jardin et cultivés à des températures comprises entre 50 et 70°. Or, suivant la température utilisée, les germes isolés sont différents, et les conclusions tirées de leur étude n'ont qu'une portée limitée. La première difficulté qui surgit donc est d'établir une classification.

SCHILLINGER (1898) fut le premier à diviser les thermophiles en deux groupes :

1°- Les vrais thermophiles avec minimum thermique élevé, ne se développant pas dans les conditions optimales des microbes ordinaires. La température la plus favorable est d'environ 60°.

2°- Les micro-organismes thermo-tolérants se développant dans une zone de température élevée, mais capables aussi de se multiplier aux températures ordinaires.

Le schéma de SCHILLINGER est pratique et utilisé par de nombreux chercheurs.

BERGEY (1919) propose une classification presque identique :

1- Les vrais thermophiles, avec optimum entre 60-70°, ne cultivent pas ou faiblement aux températures situées au-dessous de 40-45°.

2- Les thermophiles facultatifs, avec optimum à 50° environ, cultivent à 20° et arrêtent leur croissance à 60°.

MORRISON et TANNER (1924) pensent qu'il serait plus raisonnable de se baser pour la classification des thermophiles sur les températures optimales de ces germes :

1)- thermophiles stricts avec optimum au-dessus de 55° ;

2)- thermophiles facultatifs avec optimum de 50 à 55° ;

3)- formes thermo-tolérantes avec optimum d'environ 40-50°.

Peu après le travail de MORRISON et TANNER parut celui de CAMERON (1926), dans lequel ce chercheur divise les thermophiles en deux groupes en se basant surtout sur les points minima thermiques. Selon cet auteur, il faut considérer comme thermophiles les micro-organismes avec optimum thermique élevé mais ne poussant pas au-dessous de 37°, et thermo-tolérants les thermophiles capables de se développer aux températures inférieures à 37°.

Enfin, IMCHENETSKY (1944) classe tous les micro-organismes se développant à température élevée en :

1/- Thermophiles sténothermes pour lesquels le maximum thermique est d'environ 75 à 80° C., l'optimum 50-65° ; ils ne se multiplient plus, quelle que soit la composition du milieu, à 28-30°. Les thermophiles sténothermes se rencontrent rarement dans la nature.

2/- Les thermophiles eurithermes, avec maximum thermique d'environ 70-75° et optimum à 50-65° ; ils se multiplient très lentement à 28-30° et au-dessous ; on les rencontre souvent dans la nature.

3/- Les formes thermo-tolérantes avec un maximum de 60-70°, un optimum de 35-45° et un minimum de 5-10°. Contrairement aux groupes précédents, ces micro-organismes thermo-tolérants sont largement répandus dans la nature et il est probable que de nombreuses formes décrites comme thermophiles typiques sont en réalité des formes thermo-tolérantes.

Ecologie générale -

Ces germes sont très répandus dans la nature et vivent dans des milieux divers. Les premiers organismes isolés par MIQUEL et GLOBIG provenaient du sol. Ce dernier semble être, en effet, le grand réservoir des germes thermophiles.

Mais ces micro-organismes ont été également signalés dans les eaux. Les eaux thermales contiennent une flore thermophile riche et variée. De même les eaux d'égoûts sont riches en thermophiles provenant probablement de contaminations fécales. Les eaux de puits et de source contiennent peu de thermophiles ; l'augmentation de leur nombre est considérée comme la preuve d'une contamination, aussi leur numération peut-elle servir à la détermination de l'état sanitaire de l'eau.

Dans l'air, dans la neige, on constate la présence de germes thermophiles amenés par la poussière.

En très petites quantités, les thermophiles sont trouvés dans le tractus digestif des animaux. D'ailleurs, leur petit nombre et les conditions de température du milieu, peu favorables à leur activité, font supposer qu'ils ne jouent pas de rôle essentiel.

Enfin, leur rôle est prépondérant dans la maturation des composts et des fumiers et dans l'auto-échauffement des matières organiques, mais ce n'est pas le lieu de parler ici de ces phénomènes complexes, étudiés par ailleurs.

Dans tous ces milieux naturels ont été rencontrés des Bactéries, des Champignons, et ces micro-organismes, à la posi-

tion mal définie, bien que classés parmi les Bactéries, que les Actinomycètes.

D- Origine -

Ces germes thermophiles ont suggéré, quant à leur orig des hypothèses différentes. Les opinions à ce sujet sont tr controversées.

a)- L'hypothèse la plus ancienne est la théorie cosmique d'ARRHÉNIUS (1917) ; cet auteur pense que les spores des the mophiles viennent d'une planète ayant une température élevée et sont transportées sur la terre. L'auteur ignorait l'acti destructrice des rayons U.V. existant dans l'espace inter-planétaire. Cette théorie reste sans preuves scientifiques.

b)- D'autres auteurs ont vu dans les thermophiles des for-mes relictuelles descendant de germes qui ont existé à la su face du globe lorsque la température y était plus élevée qu' présent.

Cette théorie est très plausible et certains thermophi actuels pourraient être considérés comme des formes reliques

c)- La théorie de l'adaptation :

Les auteurs soviétiques, et MICHOUSTINE en particulier considèrent les thermophiles comme une forme de microbes més philes adaptés aux conditions du milieu c'est-à-dire à une v à température élevée. La majorité des microbes thermophiles et thermo-tolérants seraient dérivés des formes mésophiles.

D'après cette théorie, il serait possible d'obtenir des thermophiles à partir de mésophiles dans des cultures se développant à des températures élevées. Toujours pour les auteurs russes, les thermophiles sont plus exigeants quant à la composition du substrat nutritif, ce qui témoigne en faveur d'une origine dérivée.

Il faut cependant souligner que l'acceptation de la théorie adaptative n'exluerait pas pour ces auteurs la conception suivant laquelle certains thermophiles seraient des formes anciennes conservées à la surface de la terre depuis l'époque où les températures étaient plus élevées qu'actuellement.

Cette théorie adaptative serait confirmée, d'après MICHOUSTINE, par le fait qu'il existe un certain parallélisme entre les formes thermophiles et les formes mésophiles, d'où une certaine "parenté" entre ces micro-organismes.

d)- Une dernière théorie est la théorie mutationnelle. Dans les cultures de mésophiles apparaîtraient spontanément, indépendamment de l'influence du milieu, des cellules mutantes capables de se multiplier à des températures élevées.

Cette théorie a été formulée par LISKE (1921) et soutenue par KLUYVER et BAARS en 1932. KLUYVER et BAARS admettent que de nombreux thermophiles sont des mutants apparaissant facilement dans les milieux nutritifs de laboratoire. Ils ont adopté ce point de vue après étude de Sporovibrio thermodesulfuricans (forme thermophile) provenant pour de nombreux auteurs de Sporovibrio desulfuricans (forme mésophile).

E- Intérêt et problèmes -

Les problèmes soulevés par des micro-organismes aussi répandus et aussi particuliers sont quasi infinis et l'énumération sommaire qui suit n'en donnera qu'une idée. MICHOUSTINE dans "Les micro-organismes thermophiles dans la nature et la pratique" classe ces différents points de vue et les développe plus ou moins. Il étudie :

- le problème de la thermobiose et les caractéristiques des micro-organismes thermophiles : origine des thermophiles, adaptation de ces germes aux conditions thermiques du milieu, caractères biochimiques des cellules thermophiles et rapidité des processus provoqués par ces germes.

- les caractères morphologiques et physiologiques de ces bactéries : le cycle de leur développement, l'influence de la température, la thermo-résistance des spores, les rapports des thermophiles et du milieu (acidité, pression osmotique, etc...), la nutrition et les caractères toxiques.

- les groupes particuliers de thermophiles : les thermophiles ammonifiants, réducteurs de nitrates et de sulfates, les germes assimilant l'azote atmosphérique, attaquant la cellulose, décomposant les acides gras, etc...

- la présence des thermophiles dans différents sols de culture et leurs rapports avec l'état sanitaire du terrain.

- les thermophiles des eaux (eaux à la température ordinaire, eaux thermales et eaux d'égoûts), de l'air, des

excréments de l'homme et des animaux.

- le rôle de ces micro-organismes dans les composts, les fumiers, l'auto-échauffement des substances végétales (graines, foin, farines, etc...) ainsi que dans la préparation des conserves.

- enfin l'utilisation des germes thermophiles dans l'industrie.

Cet énoncé montre l'importance de ces bactéries et l'intérêt de leur étude.

Bien qu'il existe un grand nombre de publications concernant les thermophiles, les auteurs sont loin d'être d'accord et loin d'avoir élucidé complètement la question. Aussi des recherches nouvelles s'imposent et c'est dans ce but que nous avons abordé le sujet de notre thèse.

Nous nous sommes limitée aux bactéries thermophiles du sol, rencontrées surtout dans des sols de culture ayant perdu leurs différenciations pédologiques. Notre étude a été à point de départ essentiellement écologique, et certains aspects de la biologie des germes ont été ensuite envisagés.

PLAN DES RECHERCHES

PLAN DES RECHERCHES

Nous avons précédemment indiqué les limites des recherches que nous avons entreprises : notre travail étant essentiellement écologique, il nécessitait la mise au point de techniques d'isolement et de culture permettant l'établissement de fiches pour différents échantillons de sol. Grâce aux renseignements ainsi recueillis, nous avons pu aborder certains problèmes biologiques et morphologiques et enfin envisager une hypothèse sur l'origine de ces germes.

Ceci nous amène à établir le plan général suivant :

1°- Dans la première partie, nous décrirons les techniques nécessaires à l'isolement, la culture et l'étude des bactéries thermophiles, techniques que nous avons mises au point.

2°- Dans la deuxième partie sont données les fiches signalétiques de tous les échantillons de sol étudiés.

3°- La troisième partie sera consacrée à l'écologie de ces micro-organismes : étude de leur répartition et des facteurs de cette répartition ; écologie des groupements fonctionnels ; équilibre entre les thermophiles et les mésophiles (étudié sous un aspect statique et dynamique).

4°- Dans la quatrième partie, nous envisageons quelques aspects de la morphologie et de la biologie des bactéries thermophiles (caractères culturaux) ; la plurivalence fonctionnelle, étudiée sur une centaine de souches isolées en culture pure ; les caractères thermiques de quelques-unes de ces souches avec appréciation de leur respiration à différentes températures.

5°- Les données expérimentales obtenues précédemment nous permettront, dans une dernière partie, d'émettre une hypothèse sur l'origine de ces germes et de tenter une explication relative à leur répartition à la surface de la terre.

Pour chacun des aspects étudiés, nous donnons tout d'abord l'état actuel de la question (données bibliographiques), puis nos expériences, enfin les conclusions que nous en pouvons tirer en les situant dans le contexte des connaissances déjà acquises.

EXPOSÉ DES RECHERCHES

PREMIÈRE PARTIE

LES TECHNIQUES

PREMIÈRE PARTIE

LES TECHNIQUES

Le premier problème que pose l'étude des germes thermophiles est la mise au point des techniques. Celles qui ont été utilisées jusqu'ici sont nombreuses et très variées dans leur principe du fait que les chercheurs ont employé des moyens différents suivant le but poursuivi ; il en résulte une grande hétérogénéité d'où des résultats très difficiles à comparer entre eux. La nécessité s'impose donc de rechercher des méthodes adaptées aux conditions de cultures de ces micro-organismes et qui soient toutes, autant que possible, basées sur le même principe.

Dans cette première partie, nous décrirons les techniques anciennes, nous en ferons la critique et nous énumèrerons les méthodes que nous avons employées pour l'étude de ces germes ; en conclusion, nous envisagerons les imperfections de nos techniques et nous chercherons à savoir si elles présentent des avantages sur les précédentes.

Chapitre I

TECHNIQUES ANCIENNES

A- Température de culture -

Les thermophiles sont des germes cultivant à des tempé ratures élevées, mais comme nous l'avons dit, les auteurs n' pas adopté une température déterminée ; celle-ci peut varier entre 45 et 75° C. Or suivant la température, nous sélectio nons des germes différents, et nous nous trouvons dans des zones où le nombre des germes varie (à 45°, nous avons davan tage de germes qu'à 75°). Les températures d'incubation éta différentes, les résultats et les conclusions ne sont pas to jours confirmés. Nous verrons ultérieurement quel choix nou avons fait à ce point de vue.

B- Milieux de culture -

Les milieux de culture utilisés sont des milieux végét ou animaux.

RABINOVITCH (1895) utilise des rondelles de pomme de terre saupoudrées de terre de rue, ou de jardin. Les tubes ensemencés sont placés à 62-63° et des cultures de contrôle

faites parallèlement à 33°. Après 20 à 22 h., à 62°, apparaissent quelques colonies blanchâtres. Après 48 h., à 62°, le nombre des colonies augmente sensiblement.

Pour isoler des espèces particulières, RABINOVITCH ensemence de nouveau sur pomme de terre ; cet ensemencement ne réussit pas toujours car les rondelles de pommes de terre sèchent rapidement. Il ensemence aussi sur boîtes de Pétri gélosées à 3 % ; dans ce cas également, la croissance n'est pas toujours régulière ; elle a lieu parfois au bout de 2 ou 3 jours. Après réensemencements répétés plusieurs fois, les cultures pures sont obtenues sur gélose à 3 %.

Pour NEGRE (1913), la gélose ne pouvant être employée facilement au-dessus de 55° est remplacée essentiellement par la pomme de terre et le sérum coagulé. Cependant il utilise aussi : la gélose ordinaire, la gélose glycérinée ou sucrée, le bouillon ordinaire et le lait. Pour les isolements, des plaques de gélose sont cependant employées.

D'autres auteurs (MEDARIS en particulier) recommandent, pour l'étude de ces micro-organismes, l'emploi d'extraits d'épinards ou de pois, ou encore la farine de maïs.

MICHOUSTINE (1950) signale que les cultures peuvent être obtenues sur des milieux usuels, bien que dans certains cas les bactéries thermophiles manifestent un besoin évident en facteurs complémentaires. En général, pour déterminer la population bactérienne des échantillons étudiés, l'auteur se limite

aux formes bactériennes poussant sur un milieu gélosé à base de viande et de peptone (sauf dans des cas particuliers où il calcule le nombre de germes appartenant à tel ou tel groupe physiologique).

MICHOUSTINE utilise également les milieux à base de protéines et de saccharose. Les thermophiles se développent très rapidement. Pour que le milieu gélosé ne se dessèche pas à la température élevée, il faut le répartir en boîtes de Pétr en couche épaisse. Il est recommandé de mettre les boîtes dan une chambre humide. Cet auteur signale, sans préciser la technique, qu'il compte les germes en notant la dernière dilution où l'on a une culture. Sur les plaques de bouillon gélosé, les colonies sont dénombrées après un jour seulement de culture, donc après un séjour de courte durée.

C- Les méthodes d'ensemencement -

1/- Les unes ne sont nullement quantitatives : ce sont les méthodes d'enrichissement. Le milieu nutritif liquide (bouillon de viande peptoné, le plus souvent) est ensemencé avec le matériel étudié et maintenu à température voulue. Si le milieu se trouble, les micro-organismes trouvés sont considérés comme thermophiles. Il est évident que la méthode d'enrichissement ne peut être utilisée que pour une recherche qualitative.

2/- D'autres prétendent à être quantitatives : des suspensions-dilutions de sol servent à ensemencer des milieux

liquides. Après un séjour à l'étuve, l'auteur recherche la plus grande dilution (de taux connu) qui, ensemencée, a donné un trouble du milieu, donc une culture indiquant la présence de germes thermophiles. Des milieux solides peuvent également être ensemencés par des suspensions-dilutions de terre. Dans ce cas, il convient de compter le nombre des colonies qui apparaissent sur le milieu qui a séjourné à l'étuve un temps donné.

3/- Une méthode directe a été préconisée par ZIEMIECKA (1934). L'auteur utilise la technique de CHOLODNY et ROSSI (1928-1930) en la modifiant légèrement. L'échantillon de sol choisi est amené à la température voulue à l'aide d'un thermostat. Dans ce sol, l'auteur enfouit des lames de verre sur lesquelles sont disposées certaines substances organiques maintenues par un film de gélose. Après un certain temps nécessaire au développement de ces germes au contact du verre, les lames retirées du sol sont colorées et examinées au microscope.

C h a p i t r e II

CRITIQUE DES TECHNIQUES ANCIENNES

D'après la bibliographie, nous constatons donc que les techniques sont diverses et ne sont pas entièrement au point. Les résultats qu'elles entraînent aboutissent à des opinions opposées.

Ces divergences de vues sont dues :

1°- Au fait que les techniques ne sont pas comparables ; en effet, les milieux utilisés étant solides ou liquides, à base de pomme de terre, de protéines, de saccharose ou d'extraits végétaux, des germes différents sont sélectionnés, et les résultats obtenus varient suivant la technique employée par l'auteur.

2°- Au fait, plus grave, que les techniques elles-mêmes ne sont pas à l'abri des critiques. Les plus sérieuses peuvent être résumées ainsi :

a)- Des milieux se dessèchent rapidement (pomme de terre par exemple) ; dans ces conditions, les milieux ne résistent pas suffisamment pour que toutes les bactéries thermophiles y cultivent.

b)- Pour les milieux solides, le remplacement de la gélose par le sérum coagulé (NEGRE) ou par des rondelles de pommes de terre (RABINOVITCH) présente aussi des inconvénients : ces auteurs négligent le point de vue "écologique". De plus, nous avons, dans nos expériences, constaté que certaines souches n'apparaissent pas sur ces milieux.

c)- L'impossibilité de standardiser les extraits végétaux rend les résultats peu comparables ; il est surtout difficile de mettre en parallèle les résultats obtenus par des auteurs différents utilisant des végétaux d'origines diverses. Ajoutons que, dans la majorité des cas, la technique de préparation n'a pas été donnée.

d)- La durée d'incubation relativement courte, préconisée par MICHOUSTINE (pour éviter le dessèchement du milieu), est certainement à rejeter ; en effet, pour cet auteur, les thermophiles sont dénombrés après culture de 24 h. alors que d'autres chercheurs, et nous-même, avons observé que certaines colonies ne se manifestent qu'au bout de 3 ou 4 jours (c'est le cas de certaines colonies cultivant sur le milieu gélosé extrait de terre).

e)- L'appréciation de la richesse en thermophiles par l'abondance de la culture obtenue en milieu liquide (bouillon à base de viande ou de peptone) pendant un temps déterminé est sujette à des critiques sévères : d'une part, les germes à croissance rapide peuvent donner des cultures abondantes, bien

que leur nombre au départ soit faible ; d'autre part, avec de germes à croissance lente, la culture peut être pendant cette même durée peu abondante, bien que le nombre des micro-organismes, au départ, dans le volume d'ensemencement, puisse être nettement supérieur. Enfin, le milieu utilisé n'a pas de val écologique, il est probablement sélectif.

f)- La technique extrêmement élégante de ZIEMIECK adaptée de la méthode de CHOLODNY et ROSSI, ne permet pas une appréciation quantitative des numérations, ni l'isolement des souches et leur identification.

g)- Pour les isolements, les thermophiles doivent être, sur les milieux préconisés par les auteurs, ensemencés assez massivement ; ceci montre qu'ils ne sont pas appropriés par ailleurs, si on ne prélève qu'une petite colonie pour l'e semencement d'un second tube, celui-ci reste stérile. C'est là une lacune technique considérable.

3°- En résumé, nous avons vu que les températures utili sées sont différentes ; que les milieux qui résistent le mieu à la dessication ne sont pas "écologiques" ; parfois le temps de culture est trop court ; enfin, des méthodes permettent l'examen des thermophiles, mais leur numération et leur isole ment ne sont pas possibles.

En conclusion, ces techniques sont à revoir.

C h a p i t r e III

MISE AU POINT DES TECHNIQUES

Il était donc nécessaire de mettre au point des techniques propres aux micro-organismes thermophiles pour répondre aux difficultés rencontrées.

Il fallait tout d'abord choisir pour nos thermophiles telluriques une température de culture ; ce choix, nous l'avons fait d'après des considérations climatiques et écologiques. Nous savons en effet (travaux de BONFILS et FAURE (1955) d'une part, de GAUDEFROY et DEMOMBYNES (1955) d'autre part) que la température des sols du Sénégal, par exemple, atteint dans certains cas 55° à 60° ; la température maximum du sol du mois le plus chaud varie entre 54° (à 5 cm. de profondeur) à 57° (en surface). KILLIAN et FEHER (1939), au cours de leurs recherches sur les sols désertiques, concluent que l'optimum thermique pour les thermophiles du désert est situé entre 40 et 60° C.

D'après ces données, et pour nous rapprocher des conditions naturelles de certaines régions chaudes, il nous a semblé logique d'adopter les températures de 55 à 60°. Les tempéra-

tures inférieures à 50° nous semblent moins intéressantes et moins caractéristiques. Quant aux températures supérieures à 60°, elles sont peu courantes dans la nature, sauf dans les matières organiques en fermentation(fumier). Les données, dans ce dernier cas, sont difficilement applicables et surtout peu de germes cultivent à ces températures très élevées.

Nous avons, en définitive, pour les thermophiles telluriques que nous étudions, fixé la température de l'étuve de culture à 56°.

S'il nous a paru logique d'utiliser les techniques modernes de microbiologie du sol relatives aux mésophiles, nous avons dû les adapter aux conditions de culture des thermophiles en effet, à température élevée, comme nous l'avons dit, la gélose se dessèche rapidement, ce qui ne permet pas toujours la culture des germes ; les milieux liquides s'évaporent, et le silico-gel se transforme très vite en poussière de silice.

Pour lutter contre l'évaporation, nous employons les moyens suivants :

- augmentation de la quantité de milieu liquide réparti en tubes à essai de 22. Malgré l'évaporation, le volume du milieu reste suffisant pour assurer la prolifération des micro-organismes.

- capuchonnage des tubes qui limite l'évaporation

- emploi, pour la numération en milieu solide, de fioles de LEGROUX également capuchonnées ; leur forme permet

un contact moins grand avec l'atmosphère environnante ;

- abandon du silico-gel, ce support résistant trop mal à l'élévation de la température.

Il convient également de signaler que la température étant élevée, les germes se multiplient rapidement, les réactions sont également plus rapides, d'où la nécessité de lectures plus rapprochées dans le temps que pour les mésophiles.

Enfin, nous avons utilisé la gélose à la concentration de 15 ‰.

Nous allons décrire maintenant les techniques employées. Ces techniques portent :

I- Sur la préparation de l'extrait de terre et des suspensions-dilutions ;

II- Sur l'isolement des souches en cultures pures ;

III- Sur la numération de la microflore thermophile totale ;

IV- Sur l'activité des divers groupements correspondant aux fonctions suivantes :

- fixation de l'azote moléculaire,
- protéolyse,
- nitrification,
- dénitrification,
- amylolyse,
- hémicellulolyse,
- cellulolyse,
- réduction des sulfates.

Nous ne donnerons ici que l'essentiel des méthodes et leurs points originaux en ce qui concerne les thermophiles ; pour les détails techniques, on voudra bien se reporter à l'ouvrage de J. POCHON et coll. "Manuel technique d'analyse microbiologique des Sols", Masson et Cie, Paris.

I- PRÉPARATION DE L'EXTRAIT DE TERRE ET DES SUSPENSIONS-DILUTIONS DE SOL.

Pour nos études, isolement de souches et numération de germes en particulier, nous employerons un extrait de terre ; de plus, les milieux utilisés pour mettre en évidence la microflore totale et les différents groupements physiologiques seront ensemencés à l'aide de suspensions-dilutions de terre.

Voici les méthodes employées :

1°- Préparation de l'extrait de terre.

Choisir une terre de pH neutre, en bon état de culture. Il est recommandé de s'en tenir toujours à la même terre, cette dernière une fois choisie, pour que les résultats soient comparables, et surtout de faire ce choix avec grand soin : terre traitée par terreau et fumier, contenant donc les substances de ces milieux biologiques, pour que l'extrait soit riche et aussi peu sélectif que possible pour les bactéries.

Le mélanger à poids égal avec de l'eau de source ou de

puits (pour éviter les antiseptiques de l'eau de conduite).

Extraction à chaud en passant le mélange à l'autoclave pendant 1 heure à 130° C.

Au sortir de l'autoclave, ouvert dès refroidissement, filtrer le mélange qui s'est spontanément décanté, sur filtre papier Laurent n° 7 à chaud.

Pour obtenir un liquide de filtration parfaitement clair, ce qui est essentiel pour apprécier la culture ultérieure, filtrer plusieurs fois, si besoin est, afin que le milieu soit limpide et de teinte ambrée.

Répartir en tubes à essai de 22, à raison de 20 ml. par tube. Boucher au coton et stériliser à l'autoclave 20 minutes à 112° C.

L'extrait de terre présente une grande importance car la microflore totale est dénombrée sur cet extrait qui est également ajouté, en petites quantités, à certains milieux électifs. Gélosé à 15 ‰, il donne un milieu solide servant également à mettre en évidence la microflore totale.

Cet extrait contient les facteurs de croissance nécessaires à un grand nombre de bactéries telluriques. Il joue le rôle de l'extrait de levure ajouté à certains milieux utilisés pour les bactéries pathogènes. Pour faire croître un germe en culture pure, il est facile de trouver le ou les facteurs de croissance nécessaires à sa multiplication ; mais pour l'ensemble de la microflore, il convient d'avoir le plus grand nombre

possible de facteurs, permettant la multiplication du maximum de germes sans qu'il y ait sélection par besoins nutritionnels. L'extrait de terre remplit au mieux cette condition. Il est un milieu naturel pour les bactéries telluriques et, en particulier les thermophiles du sol. JAMES (1958) signale que l'extrait de terre contient des facteurs de croissance non identifiés.

Nous obtenons ainsi un milieu de référence dont la composition doit être constante, ce qui permet de comparer les différents échantillons au point de vue de la microflore totale. Nous devons signaler l'importance du choix de la terre servant à préparer le milieu et les inconvénients qui peuvent survenir dans le cas où la terre de référence est remplacée par un sol différent.

2°- Préparation des suspensions-dilutions de terre.

La technique décrite devra être utilisée pour tous les ensemencements ; elle doit être conduite de façon rigoureuse :

- Préparer sur un portoir une série de 10 tubes à essai de 22, stériles.

- A l'aide d'une pipette de 20 ml. stérile, 18 ml. d'eau stérile sont répartis stérilement dans chaque tube, sauf dans le premier où l'on en mettra 27.

- 3 grammes de terre, obtenue la plus homogène possible, sont pesés.

- Broyer au mortier stérile, d'abord à sec, puis avec les 27 ml. d'eau du premier tube.

- 2 ml. sont prélevés à la pipette stérile et introduits dans le deuxième tube de la série, tube qui contient 18 ml. d'eau distillée stérile. Agiter. Ce tube représente la dilution au 1/100 ou 10^{-2}.

- A l'aide d'une autre pipette de 2 ml. stérile introduite dans le tube de dilution 10^{-2}, agiter le contenu en soufflant dans la pipette. Au moment où la dilution 10^{-2} est bien homogénéisée, en prélever 2 ml. avec cette même pipette. Ces 2 ml. sont introduits dans le troisième tube de la série, et ainsi de suite.

- On obtient ainsi une série de dilutions-suspensions de sol de 10^{-1} à 10^{-10}.

Ensemencement.

Les dilutions-suspensions obtenues de cette manière doivent être immédiatement ensemencées dans le milieu extrait de terre. Leur conservation du jour au lendemain même à la glacière est à déconseiller.

II- ISOLEMENT DES SOUCHES EN CULTURE PURE -

Pour étudier certains caractères de ces germes comme la respirométrie, il était indispensable d'avoir ces germes en cultures pures.

Les difficultés d'isolement des thermophiles viennent du fait qu'à 56° la gélose se dessèche rapidement et qu'ainsi les micro-organismes cultivent mal. Les techniques habituelle ont dû être adaptées à ce problème.

1°- Pour isoler les germes à partir d'un milieu liquide, par exemple le milieu pour germes amylolytiques, l'échantillon de terre est ensemencé sur ce milieu. Après culture à 56°, les derniers tubes positifs sont conservés (avec ceux-ci, nous avons plus de chances d'avoir une culture pure). Une petite quantité de ce milieu est étalée en stries à la surface de tubes de 22 contenant le même milieu gélosé à 15 ‰. Les tube sont capuchonnés et placés à 56°. Après 1, 2 ou 3 jours d'étu on prélève une colonie isolée. Cette dernière est repiquée su le même milieu, ou directement en extrait de terre. La pureté de la souche est contrôlée par examen microscopique.

2°- Pour isoler les germes sur milieu solide, non sélect c'est-à-dire sur gélose - extrait de terre, nous avons dû utiliser une technique différente. En effet, si l'on étale sur gélose - extrait de terre une culture en milieu liquide, plusieurs passages sur le milieu solide sont nécessaires pour iso les colonies différentes. Or, après plusieurs repiquages sur gélose - extrait de terre, les colonies deviennent minuscules. Il est difficile de les prélever. Pour éviter cette complication, on ensemence la suspension-dilution de terre dans la

gélose - extrait de terre maintenue liquide au bain-marie ; on agite, de manière à répartir les germes dans la masse et le tout est enfin coulé en boîtes de Legroux qui sont placées à 56°. Après culture, on choisit les boîtes où la dilution ensemencée est telle que les colonies soient nettement séparées. Celles-ci sont prélevées à l'aide de pipettes Pasteur et ensemencées directement dans le milieu liquide (extrait de terre). La pureté de la souche est contrôlée par examen microscopique comme précédemment.

III- NUMÉRATION DE LA MICROFLORE THERMOPHILE TOTALE -

La numération peut se faire en milieu liquide et en milieu solide.

UMÉRATION EN MILIEU LIQUIDE -

- Principe.

Le principe est le suivant : on ensemence, avec des suspensions-dilutions de sol, l'extrait aqueux de terre, et les tubes où apparaît une culture sont dénombrés.

Pour l'ensemencement en milieu liquide, nous utilisons 1 ml. de suspension-dilution de sol par tube de 20 ml. de milieu, et nous ensemençons 5 tubes par dilution, de 10^{-1} à 10^{-10}.

Les tubes sont placés à l'étuve à 56° C.

b)- Lecture des résultats.

Après 5 et 7 jours, on note le nombre de tubes positifs, c'est-à-dire ceux ayant donné lieu à une culture. Celle-ci es appréciée par ses diverses manifestations : trouble, dépôt, voile.

c)- Interprétation.

Compter le nombre de tubes positifs par dilution, calcul "le chiffre caractéristique" et déterminer le nombre de germes par gramme de terre d'après les tables de Mc. CRADY, comme indiqué ci-dessous.

d)- Mode de calcul du nombre de germes par g. de terre.

En se basant sur le nombre de tubes positifs trouvés dan 3 dilutions successives significatives, on peut déterminer, au moyen des tables statistiques de Mc. CRADY, le nombre probable de germes dans les dilutions d'ensemencement ; il est ensuite facile de calculer ce même nombre par g. de terre.

Principe de la méthode de Mc. CRADY -

Presque toutes les techniques exposées comportent l'ense mencement, avec un volume défini de suspensions-dilutions de terre, d'un milieu réparti en tubes, à raison de 3 ou 5 tubes par dilution.

La lecture des résultats consiste à compter le nombre de tubes + (impliquant une culture) pour chaque dilution. Pour chacun de ces tubes +, on doit admettre que la présence d'un

germe vivant est nécessaire et suffisante dans le volume de dilution ayant servi à ensemencer. (Ce postulat pêche par défaut car on sait qu'un grand nombre d'espèces bactériennes ne donnent pas de culture dans les conditions habituelles, à partir d'une seule cellule ; le nombre de germes calculé est donc toujours un minimum).

La technique de Mc CRADY consiste à déterminer, par le calcul des probabilités, le nombre de germes contenus dans le volume de dilution ayant servi à ensemencer ; cette détermination se base sur le nombre de tubes positifs, trouvé pour quelques dilutions consécutives et significatives, ceci grâce à l'emploi de tables statistiques.

Il est facile ensuite, par le calcul, de remonter au nombre de germes par gramme de terre.

Il est bien évident que, si la technique envisagée comporte plusieurs lectures échelonnées dans le temps, c'est sur la dernière lecture pratiquée que porte le calcul du nombre de bactéries du groupement.

Mise en ordre des résultats -

Porter sous chaque dilution le nombre de tubes + et -.

Quatre exemples sont donnés ci-dessous.

	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
Exemple I 3 tubes par dilution	3	3	3	2	1	0	0	0
Exemple II 5 tubes par dilution	5	3	2	0	0	0	0	0
Exemple III 5 tubes par dilution	5	5	5	5	3	2	2	0
Exemple IV 5 tubes par dilution	2	1	2	0	0	0	0	0

Détermination du "nombre caractéristique" -

Ce nombre "caractéristique" a 3 chiffres.

La dernière dilution (en allant de gauche à droite) où tous les tubes sont + sera le premier chiffre du nombre caractéristique ; les deux suivants sont ceux du nombre de tubes + pour chacune des deux dilutions suivantes.

Pour les mêmes exemples, on trouve :

Ex. : I 321 pour la dilution 10^{-3},

II 532 - - 10^{-1},

III 534 - - 10^{-4}.

(En effet, le nombre caractéristique ne peut être 5322 puisque les chiffres ne sont prévus que pour 3 chiffres ; dans ce cas, on ajoute le dernier à celui qui le précède).

Ex. IV = 212 pour la dilution 10^{-1}.

(En effet, quand la dilution la plus concentrée, elle-même, n'a pas tous ses tubes +, les tables donnent cependant

un nombre caractéristique).

Détermination du nombre de germes dans le volume d'ensemencement -

Il est donné par les tables, en face du nombre caractéristique. Pour les mêmes exemples, en admettant que l'ensemencement ait été fait avec 1 ml., on trouve :

Ex.	I	15	germes dans 1 ml. de la dilution		10^{-3}
	II	14	-	-	10^{-1}
	III	20	-	-	10^{-4}
	IV	1,2	-	-	10^{-1}

Calcul du nombre de germes par gramme de terre -

Il suffit de multiplier le nombre précédemment trouvé par la puissance de la dilution. (Si l'ensemencement avait été fait avec un volume différent de 1 ml., il faudrait évidemment en tenir compte, par exemple avec 0,5 ml. il faudrait multiplier par 2). Ce qui donne pour les exemples précédents :

Ex. I = 15×10^{3}

Ex. II = 14×10^{1}

Ex. III = 20×10^{4}

Ex. IV = $1,2 \times 10^{1}$

MÉRATION SUR MILIEU SOLIDE -

ilieu -

Le milieu est un extrait de terre, gélosé à 15 %. La gélose utilisée est préalablement lavée à l'eau courante pen-

dant 48 h.. Elle est mélangée au volume correspondant d'ext
de terre et le mélange est chauffé jusqu'à dissolution compl
Le pH doit être vérifié ; le milieu est ajusté à pH 7 si bes
est, puis filtré sur papier et réparti en tubes à essai de 2
à raison de 25 ml. par tube. Ceux-ci sont stérilisés à 112°

b- Ensemencement -

Au moment de l'emploi, faire fondre la gélose extrait
terre en plaçant les tubes au bain-marie à 100° C. Lorsque
gélose est fondue, retirer les tubes de l'eau bouillante, et
quand la température atteint 45° C, les ensemencer à l'aide
suspensions-dilutions de terre préparées suivant la techniqu
habituelle : 1 ml. par tube, 5 tubes par dilution, versés en
boîte de Legroux ; les boîtes sont abandonnées horizontaleme
jusqu'à ce que la gélose prenne en masse ; les fioles sont
alors retournées (pour éviter à l'eau de condensation de ret
ber sur le milieu de culture) et capuchonnées, puis mises à
l'étuve à 56°.

Il est possible d'ensemencer les boîtes en surface à
l'aide de deux gouttes de suspension-dilution de terre. Dan
ce cas, la gélose doit être bien sèche et l'étalement se fai
à l'aide d'une pipette Pasteur coudée.

c- Lecture des résultats -

Au bout de 5 jours, on compte le nombre de colonies ;
moyenne des chiffres obtenus permet de calculer le nombre de

germes par gramme de terre.

IV- ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ DE DIVERS GROUPEMENTS PHYSIOLOGIQUES -

Pour l'étude des différents groupes physiologiques thermophiles, deux solutions sont fréquemment employees pour la préparation de nos milieux : la solution saline de WINOGRADSKY et la solution d'oligo-éléments, utilisée au laboratoire.

a)- Solution saline standard de WINOGRADSKY -

Phosphate bipotassique	5 g.
Sulfate de magnésium	2,5 g.
Chlorure de sodium	2,5 g.
Sulfate ferrique	0,05 g.
Sulfate de manganèse	0,05 g.
Eau	1.000 ml.

b)- Solution d'oligo-éléments -

Molybdate de potassium	0,05 g.
Berate de sodium	0,05 g.
Perchlorure de fer	1 goutte
Nitrate de cobalt	0,05 g.
Sulfate de cadmium	0,05 g.
Sulfate de cuivre	0,05 g.
Sulfate de zinc	0,05 g.
Sulfate de manganèse	0,05 g.
Eau distillée	1.000 ml.

Nous mesurons l'activité physiologique de ces divers groupes par des courbes.

Tracé des courbes d'activité des groupements physiologiques

Toutes les méthodes comportent des lectures multiples échelonnées dans le temps et des ensemencements avec des sér de dilutions-suspensions ; elles mettent en évidence une pro gression du métabolisme du substrat en fonction des dilution et au fur et à mesure des lectures successives.

C'est cette progression que traduit la courbe : diluti en ordonnées, temps en abscisses (pour être plus précise, no calculons, pour chaque point, la dilution moyenne qui donner 50 % de tubes positifs).

1/- LA FIXATION DE L'AZOTE MOLÉCULAIRE -

Dans la fixation de l'azote atmosphérique par les micr organismes libres, deux cas sont à envisager :

a)- la fixation en aérobiose (effectuée surtout par les Azotobacter),

b)- la fixation en anaérobiose (dont le rôle pri cipal revient aux Clostridium).

a)- Fixation en aérobiose -

Principe -

Ensemencement avec des suspensions-dilutions de terre, d'un milieu liquide ne contenant pas d'azote combiné, répart

en tubes bien aérés ; appréciation d'une culture (essentiellement Azotobacter) par la formation d'un voile (J. AUGIER, 1956).

Milieu -

Solution saline standard	50 ml.
Mannitol	10 g.
Extrait de terre	10 ml.
Solution d'oligo-éléments	1 ml.
Carbonate de calcium	0,5 g.
Eau distillée	1.000 ml.

Répartir en tubes à essai de 22 à raison de 10 ml. par tube. Ensemencer 1 ml. de suspension-dilution par tube ; 5 tubes par dilution de 10^{-1} à 10^{-6} ; étuve à 56°.

Observer, après 4 et 7 jours, les tubes ou s'est formé un voile d'Azotobacter et déterminer le nombre de germes par gramme de terre.

Fixation en anaérobiose -

Principe -

Ensemencement avec des suspensions-dilutions de terre d'un milieu liquide ne contenant pas d'azote combiné, réparti en tubes peu aérés ; appréciation d'une culture (essentiellement Clostridium pastorianum) par dégagement gazeux (J. AUGIER, 1957).

Milieu -

Solution saline standard	50 ml.
Phosphate monopotassique	0,75 g.

Soude décinormale	33 ml.
Glucose	10 g.
Extrait de terre	10 ml.
Solution d'oligo-éléments	1 ml.
Eau distillée	1.000 ml.

Répartir en tubes à essai de 17 à raison de 10 ml. par tube ; mettre dans chacun d'eux une petite cloche de Durham. Ensemencer 1 ml. de suspension-dilution par tube ; 5 tubes par dilution, de 10^{-1} à 10^{-8} ; capuchonner les tubes ou mieux les sceller pour éviter la dessication ; étuve à 56°.

Apprécier, par la présence de gaz dans les petites cloches, les tubes où s'est produite une culture de Clostridium fixateurs ; lecture après 4 et 7 jours.

2/- LA PROTÉOLYSE -

Principe -

Ensemencement avec des suspensions-dilutions de terre d'un milieu salin additionné de gélatine comme seule source de carbone et d'azote. L'appréciation de la protéolyse se fait par la liquéfaction de la gélatine en fonction du temps et des dilutions* (J. LAJUDIE et J. POCHON, 1956).

(*)- Des réserves théoriques doivent être faites sur la protéi très particulière qu'est la gélatine ; cependant, comme elle s prêtait particulièrement bien au but que nous nous proposions, et que, pratiquement, elle nous donnait des résultats interpré tables, nous l'avons conservée.

Milieu -

Solution saline standard	50 ml.
Gélatine	30 g.
Eau	1.000 ml.

Ajuster à pH 7,2. Répartir à chaud, en tubes de 22, à raison de 20 ml. par tube.

Ensemencer 1 ml. de suspension-dilution par tube ; 3 tubes par dilution de 10^{-1} à 10^{-10}. Etuve à 56° C.

Lire après 1, 2, 3, 4 et 7 jours ; porter les tubes à la glacière après les avoir agités (à + 2° ou à + 4°) pendant 1 h.30. On considère que la protéolyse s'est produite dans les tubes où le milieu est resté liquide par attaque de la gélatine. Reporter tous les tubes à l'étuve pour les lectures des jours suivants. Tracer la courbe d'activité en fonction du temps et des dilutions, et calculer le nombre de germes par g. de terre.

A NITRIFICATION -

Principe -

On recherche séparément l'activité des ferments nitreux et celle des ferments nitriques. Ensemencement, avec des suspensions-dilutions de terre, de deux milieux électifs liquides répartis en tubes.

Pour la recherche des ferments nitreux, l'azote est fourni sous forme de sulfate d'ammonium et on lit, après incubation, la dilution limite contenant des nitrites ou des nitrates par la diphénylamine sulfurique.

Pour la recherche des ferments nitriques, l'azote est fourni sous forme de nitrite de sodium et on lit, après incubation, la dilution limite contenant des nitrates, on utilise le même réactif que ci-dessus après élimination des nitrites. (O. COPPIER et H. de BARJAC, 1952).

Milieux -

A- Ferments nitreux		B- Ferments nitriques	
Solution saline standard	50 ml.	Solution saline standard	50 m
Sulfate d'ammonium	0,5 g	Nitrite de sodium	1 g
Carbonate de calcium	1 g.	Carbonate de calcium	1 g
Eau distillée	950 ml.	Eau distillée	950 m

Répartir en tubes de 22.

Ensemencer 1 ml. de suspension-dilution par tube ; 3 tubes par dilution de 10^{-1} à 10^{-6}. Capuchonner les tubes ; étuve à 56°.

Lire les résultats, après 1 semaine, et déterminer le nombre de germes nitreux d'une part, nitriques d'autre part, par gramme de terre.

4/- LA DÉNITRIFICATION -

Principe -

Ensemencement, avec des suspensions-dilutions de terre, d'un milieu liquide où l'azote est fourni sous forme de nitrate ; recherche de la disparition de ces nitrates en fonction du temps et des dilutions par la diphénylamine sulfurique après

élimination par l'urée des nitrites formés. (H. de BARJAC, 1952).

Milieu -

Solution saline standard	50 ml.
Nitrate de potassium	2 g.
Glucose	10 g.
Carbonate de calcium	5 g.
Solution d'oligo-éléments	1 ml.
Eau distillée	1.000 ml.

Répartir en tubes à essai de 22, à raison de 20 ml. par tube.

Ensemencer 1 ml. de suspension-dilution par tube, 3 tubes par dilution, de 10^{-1} à 10^{-8} ; capuchonner les tubes ; étuve à 56°.

Après 1, 2, 3, 4 et 7 jours, prélever stérilement dans chaque tube à l'aide d'une pipette Pasteur stérile quelques gouttes de liquide et rechercher la disparition des nitrates.

Compter à chaque lecture le nombre de tubes + (sans nitrates) pour chaque dilution et tracer la courbe de disparition de ces nitrates, en fonction du temps et des dilutions, et évaluer le nombre de germes par gramme de terre.

L'AMYLOLYSE -

Principe -

Ensemencement avec des suspensions-dilutions de terre,

d'un milieu liquide électif où l'amidon est la seule source de carbone ; recherche de l'hydrolyse au moyen du réactif iodo-ioduré, en fonction du temps et des dilutions (de BARJAC et CHALVIGNAC, 1954).

Milieu -

Solution saline standard	50 ml.
Amidon soluble	2 g.
Solution d'oligo-éléments	1 ml.
Eau distillée	1.000 ml.

Répartir en tubes à essai de 22, à raison de 20 ml. par tube.

Ensemencer 1 ml. de suspension-dilution par tube ; 3 tubes par dilution, de 10^{-1} à 10^{-8}. Capuchonner les tubes. Etuve à 56° C.

Lire après 1, 2, 3, 4 et 7 jours, en prélevant stérilement 1 ml. de milieu dans chaque tube, et y révéler l'attaque de l'amidon par le réactif iodo-ioduré. Tracer la courbe de l'hydrolyse de l'amidon en fonction du temps et des dilutions, et déterminer le nombre de germes amylolytiques par gramme de terre.

6/- L'HÉMICELLULOLYSE -

Principe -

Ensemencement avec des suspensions-dilutions de terre, d'un milieu sélectif où les hémicelluloses représentent la

seule source de carbone, le nitrate de potassium celle d'azote ; rechercher l'hydrolyse des hémicelluloses en fonction du temps et des dilutions. Lecture complexe qui a pour but de mettre en évidence le début d'hydrolyse (premier stade) et l'hydrolyse presque complète (deuxième stade). (J. AUGIER, 1956).

Milieu -

Solution saline standard	50 ml.
Extrait de terre	3 ml.
Nitrate de potassium	0,4 g.
Hémicelluloses*	1 g.
Carbonate de calcium	1 g.
Oligo-éléments	1 ml.
Eau distillée	1.000 ml.

Répartir en tubes de 17, 10 ml. par tube.

Ensemencer 1 ml. de suspension-dilution par tube ; 3 tubes par dilution, de 10^{-1} à 10^{-8}. Etuve à 56° C.

Pour la lecture, prélever stérilement après le 1er, 2e, 3e, 4e et 7e jour, dans chaque tube, 0,5 ml. de milieu, et le porter dans un tube de Kahn pour y effectuer la double réaction indiquée par l'auteur. Tracer les courbes d'hydrolyse (stade I et stade II) en fonction du temps et des dilutions, et déterminer le nombre de germes hémicellulolytiques par gramme de terre.

(*)- Ne se trouvent pas dans le commerce. A préparer selon la technique de l'auteur.

7/- LA CELLULOLYSE -

Principe -

La mise en évidence se fait sur un milieu où la source carbonée est représentée par une feuille de papier filtre. Le milieu est ensemencé avec des suspensions-dilutions de terre comprises entre 10^{-1} et 10^{-3} (les dilutions pouvant se faire de 1/2 en 1/2 pour augmenter la précision). Les germes cellulolytiques apparaissent sur le papier qui est plus ou moins attaqué par les germes et peut finir par disparaître.

Milieu -

Solution saline standard	50 ml.
Nitrate d'ammonium	2 g.
Peptone pepsique	1 g.
Eau de levure	20 ml.
Extrait de terre	20 ml.

Amener à pH 7,2 avec de la soude.

Ajouter 10 g. de carbonate de calcium.

Répartir en tubes de 22 et en tubes de 17, en veillant à ce que le CO_3Ca reste en suspension pendant cette opération.

Dans chaque tube, on aura déposé préalablement une petite bande de papier Durieux de 1 cm. de large et de 6 cm. de haut environ.

Ensemencer :

a)- Pour les anaérobies, 1 ml. de suspension-dilution

par tube à essai de 17, 3 tubes par dilution. Puis ces tubes sont étirés, désaérés et scellés sous vide.

De temps en temps, agiter légèrement les tubes pour remettre en suspension CO_3Ca et assurer ainsi neutralisation du milieu.

b)- Pour les aérobies, opérer de la même façon en tube à essai de 22 ; capuchonner et placer à 56° C.

Lecture des résultats -

Lors de l'agitation des tubes, on constate plus ou moins rapidement un ramollissement de la feuille de papier qui, en même temps, se recouvre souvent de taches jaunes, brunes ou noires. Ces altérations traduisent l'attaque de la cellulose.

C'est en fonction de la vitesse d'apparition de ces modifications que l'on juge de l'activité de l'échantillon. Malheureusement, il est rare que les 3 tubes se modifient simultanément et même que les 3 soient le siège d'une cellulolyse. Aussi la méthode est-elle très approximative et seulement comparative.

RÉDUCTION DES SULFATES -

Principe -

Ensemencement, en anaérobiose, avec des suspensions-dilutions de terre, d'un milieu liquide contenant un sulfate, de l'azote minéral, un donateur d'hydrogène, et des traces d'un sel de fer comme indicateur de formation de SH_2 (terme

de la réduction des sulfates) ; la présence d'une culture se traduit par un précipité noir de sulfure de fer.

Milieu -

Chlorure d'ammonium	1 g.
Phosphate bipotassique	0,5 g.
Sulfate de magnésium	2 g.
Sulfate de sodium	0,5 g.
Chlorure de calcium	0,1 g.
Solution de lactate de sodium à 60 %	6 ml.
Eau distillée	1.000 ml.

Répartir en tubes à essai de 17, 5 ml. par tube.

Ensemencer 1 ml. de suspension-dilution par tube, 3 tubes par dilution, de 10^{-1} à 10^{-5}. Ajouter 4 gouttes par tube d'une solution :

Sel de Mohr	1 g.
Eau distillée	9 ml.

Etirer les tubes ; désaérer et sceller sous vide. Etuve à 56° C.

Lire après 3 semaines en comptant pour chaque dilution les tubes où s'est formé un précipité noir ou une teinte gris-noir du milieu, et calculer le nombre de germes par gramme de terre.

Chapitre IV

CONCLUSIONS

Les comparaisons des données bibliographiques d'une part, et de l'exposé de nos techniques d'autre part, permettent d'apprécier les gains acquis.

1°- Nos milieux supportent parfaitement un séjour prolongé (plus de 10 jours) aux températures utiles, alors que les techniques anciennes ne supportent une température élevée que deux ou trois jours. Ce fait est essentiel puisqu'il nous permet d'obtenir la culture de certaines bactéries thermophiles dont la croissance est lente, alors que la majorité des auteurs arrêtant l'expérimentation très tôt négligent ces germes.

2°- Au point de vue qualitatif, les méthodes permettent d'apprécier la distribution des différents groupes physiologiques, donc rendent possible une étude écologique approfondie. Ces techniques étant basées sur le même principe, la comparaison est aisée.

3°- Les techniques sont également quantitatives ; il est possible d'obtenir des numérations de thermophiles, aussi bien

des germes à croissance lente que des germes dont la cr
est rapide.

4°- Les résultats obtenus étant comparables aux d
acquises avec des techniques basées sur les mêmes princ
dans le domaine des mésophiles, l'écologie relative de
groupes de germes devient possible. Or, ce domaine n'a
été étudié, les auteurs n'ayant pas à leur disposition
techniques parallèles pour l'étude des mésophiles et de
mophiles.

5°- Cependant, nous sommes parfaitement conscient
fait que nos techniques sont encore critiquables comme
d'un point de vue tout à fait général, toutes celles ut
en microbiologie du sol. Nous saurons ne pas leur dema
plus qu'elles ne peuvent donner et nous attribuerons à
sultats une valeur comparative plus qu'une valeur absol

DEUXIÈME PARTIE

FICHES SIGNALÉTIQUES DES ÉCHANTILLONS

DEUXIÈME PARTIE

FICHES SIGNALÉTIQUES DES ÉCHANTILLONS

Dans cette deuxième partie, nous étudierons un certain nombre d'échantillons, et nous donnerons pour chacun d'eux divers renseignements.

Les origines de ces échantillons sont diverses ; un gra nombre a été recueilli en France, d'autres proviennent du Sahara, d'Afrique Equatoriale, un d'Egypte et un autre de l'Antarctique.

Les climats sous lesquels ils ont été prélevés sont dor très différents puisque nous passons du climat tempéré au climat équatorial et au climat polaire.

Quant à leur origine pédologique, elle est variée puisq nous avons des sols de jardin, de prairie, de vignoble, des boues, des terreaux, des sables, etc...

Pour chaque prélèvement, nous indiquerons le lieu du prélèvement et sa profondeur, le type de sol, et nous décri- rons très brièvement la végétation.

Les analyses chimiques nous permettront de connaître la

teneur en matière organique, en carbone, en azote et en humus. Le taux d'humidité sera également calculé pour chaque échantillon de sol.

Enfin, des analyses microbiologiques nous donneront une vue d'ensemble du nombre total de germes thermophiles et nous pourrons apprécier différentes fonctions : la fixation de l'azote en aérobiose et en anaérobiose, la nitrification, la protéolyse, la dénitrification, la cellulolyse, l'hémicellulolyse, l'amylolyse et la réduction des sulfates.

L'activité des principales fonctions (protéolyse, amylolyse, dénitrification et hémicellulolyse) sera représentée graphiquement en portant les temps en abscisses et les dilutions atteintes par la fonction étudiée en ordonnées.

Les fiches signalétiques vont, grâce à leurs données, nous fournir les renseignements nécessaires à l'écologie des bactéries thermophiles, c'est-à-dire leur répartition et les facteurs de cette répartition. En plus, elles nous permettront de rechercher les différentes fonctions exercées par ces germes et de mettre en évidence l'équilibre thermophiles/mésophiles (équilibre étudié sous un aspect statique et dynamique).

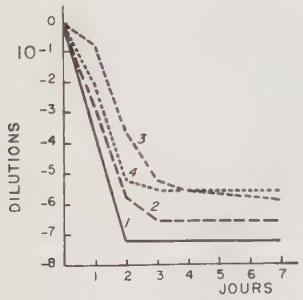
Nous grouperons nos fiches en fonction de l'origine géographique des échantillons : tout d'abord ceux de France, puis ceux d'Afrique (Sahara, Afrique Equatoriale, Egypte), et enfin celui de l'Antarctique.

PRÉLÈVEMENTS RECUEILLIS EN FRANCE

DÉSIGNATION DU PRÉLÈVEMENT

FRANCE - T P

Lieu : Institut Pasteur, Paris - Date : 6 Février 1956.
Type de sol : Terreau.
Végétation : culture maraichère.
Profondeur : 5 - 10 cm.
Humidité : 52,5 ‰.
Matière organique : 383 ‰.
C : 9,2 % - N : 1,1 % - C/N : 8,3 - Humus : 0,816 %.
Microflore totale : Milieu liquide : 35.000.000 g/g
Milieu solide : 17.500.000 g/g
Fixation aérobie de l'N : 0
anaérobie de l'N: 0
Nitrification : nitreux : 0
nitriques : 0
Protéolyse = 25.000.000 g/g - Voir courbe.
Dénitrification = 450.000 g/g - Voir courbe.
Cellulolyse : aérobie = + à 10^{-1}
anaérobie = + à 1/64
Hémicellulolyse = 95.000 g/g - Voir courbe.
Amylolyse = 2.500.000 g/g - Voir courbe.
Réduction de SO_4 = + à la dilution 1/512.



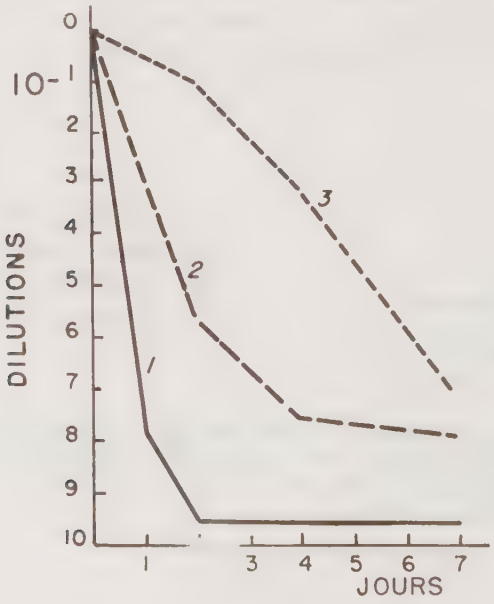
1 : Protéolyse
2 : Amylolyse
3 : Dénitrification
4 : Hémicellulolyse

(1)- Les légendes sont valables pour les tableaux suivants.
L'expression g/g a été adoptée pour indiquer le nombre de germes par gramme de sol.

DÉSIGNATION DU PRÉLÈVEMENT

FRANCE - T S C

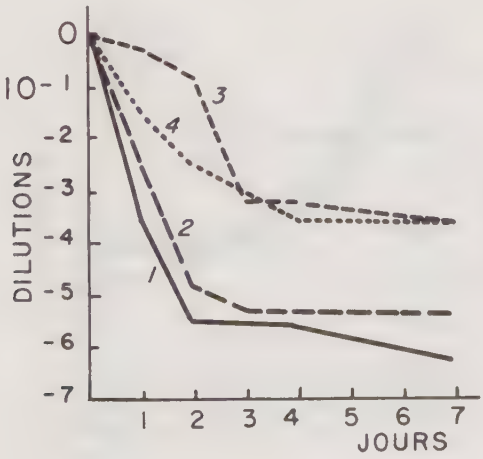
Lieu : St-Cloud (S. & O.) - Date : 17 Mars 1958.
Type de sol : Terreau d'origine végétale.
Végétation : culture maraîchère.
Profondeur : 5-10 cm.
Humidité : 55 %.
Matière organique : 312 %.
C : 10,5 % - N : 0,67 - C/N : 15 - Humus : 0,685 %.
Microflore totale : Milieu liquide : 140.000.000 g/g
Milieu solide : 80.000.000 g/g
Fixation aérobie de l'N : 0
anaérobie de l'N : 0
Protéolyse = 95.000.000 g/g - Voir courbe.
Dénitrification = 950.000 g/g - Voir courbe.
Cellulolyse aérobie = + à 10^{-1}
anaérobie = + à 10^{-1}
Amylolyse =45.000.000 g/g - Voir courbe.
Réduction de SO^4 = 0.



DESIGNATION DU PRÉLÈVEMENT

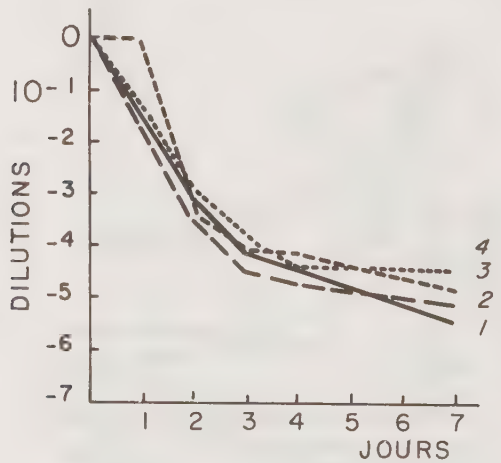
FRANCE - G

Lieu : Garches (S. & O.) - Date : 28 Novembre 1955.
Type de sol : Terre en jachère.
Profondeur : 5-10 cm.
Humidité : 1 %.
Matière organique : 83 %.
C : 3 % - N : 0,350 % - C/N : 8,8 - Humus : 0,204 %.
Microflore totale : Milieu liquide : 1.900.000 g/g.
Milieu solide : 1.400.000 g/g.
Fixation aérobie de l'N : 0
anaérobie de l'N : 0
Nitrification : nitreux : 0
nitriques : 0
Protéolyse = 950.000 g/g. - Voir courbe.
Dénitrification = 25.000 g/g. - Voir courbe.
Cellulolyse : aérobie : 0
anaérobie : + à 1/128.
Hémicellulolyse : 600 g/g. - Voir courbe.
Amylolyse = 95.000 g/g. - Voir courbe.
Réduction de SO_4 = + à la dilution 1/64.



DESIGNATION DU PRÉLÈVEMENT
FRANCE - Fv

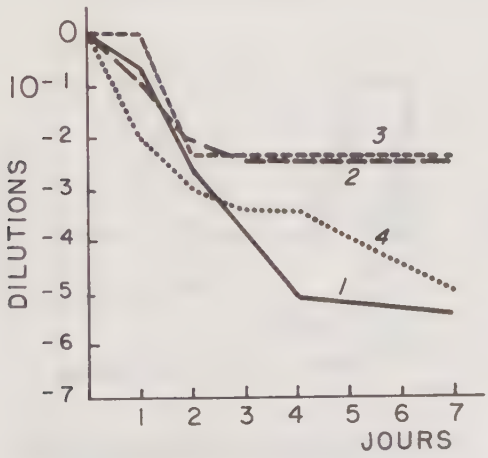
Lieu : Ferme de Grignon (S. & O.) - Date : 7 Mai 1956.
Type de prélèvement : fumier de vache.
Humidité : 65 ‰.
Matière organique : 750 ‰.
C : 23 % - N : 1,190 % - C/N : 19 - Humus : 0,01 %.
Microflore totale : Milieu liquide : 1.600.000 g/g.
Milieu solide : 200.000 g/g.
Fixation aérobie de l'N : 0
anaérobie de l'N : 0
Nitrification : nitreux : 0
nitriques : 0
Protéolyse = 250.000 g/g. - Voir courbe.
Dénitrification = 45.000 g/g. - Voir courbe.
Cellulolyse : aérobie = + à 1/4.
anaérobie = + à 1/256.
Hémicellulolyse = 25.000 g/g. - Voir courbe.
Amylolyse = 95.000 g/g. - Voir courbe.
Réduction de SO_4 = + à la dilution 1/1024.



DESIGNATION DU PRELEVEMENT

FRANCE - L R

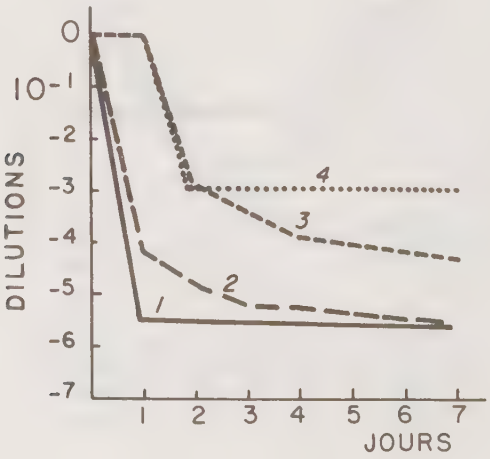
Lieu : La Rochefoucauld (Ch^{te}) - Date : 28 Mai 1956.
Type de sol : jardin.
Végétation : culture maraîchère.
Profondeur : 10 - 50 - 90 cm.
Humidité : 9,5 ‰.
Matière organique : 83 ‰.
C : 1,2 % - N : 0,266 % - C/N : 4,6 - Humus : 0,193 %.
Microflore totale : Milieu liquide : 700.000 g/g.
Milieu solide : 170.000 g/g.
Fixation aérobie de l'N : 0
anaérobie de l'N : 0
Protéolyse = 250.000 g/g.
Dénitrification = 250 g/g.
Cellulolyse : aérobie = 0
anaérobie = + à 1/32.
Hémicellulolyse = 60.000 g/g.
Amylolyse = 250 g/g.
Réduction de SO_4 = +++ à 1/16.



DÉSIGNATION DU PRÉLÈVEMENT

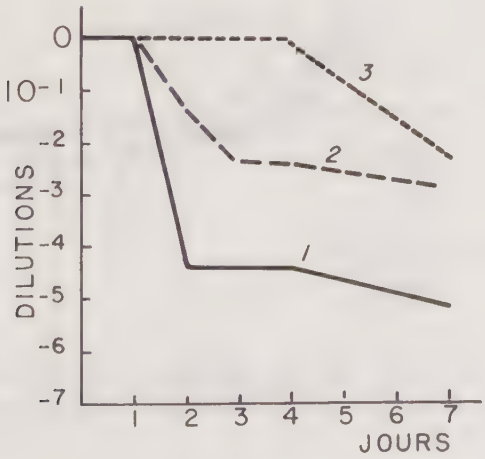
FRANCE - Bc

Lieu : Châteaufort (Seine) - Date : 2 Juillet 1956.
Type de sol : boue de ruisseau.
Profondeur : 0 à 3 cm.
Humidité : 10 %.
Matière organique : 75,5 %.
C : 1,2 % - N : 0,16 % - C/N : 7,5 - Humus : 0,140 %.
Microflore totale : Milieu liquide : 500.000 g/g.
Milieu solide : 100.000 g/g.
Fixation aérobie de l^1N : 0
anaérobie de l^1N : 0
Nitrification : nitreux : 0
nitriques : 0
Protéolyse : 250.000 g/g. - Voir courbe.
Dénitrification : 9.500 g/g. - Voir courbe.
Cellulolyse aérobie : 0
anaérobie : + à 1/16.
Hémicellulolyse = 600 g/g. - Voir courbe.
Amylolyse = 95.000 g/g. - Voir courbe.
Réduction de SO_4 = +++ à la dilution 1/256.



DÉSIGNATION DU PRÉLÈVEMENT
FRANCE - S_B

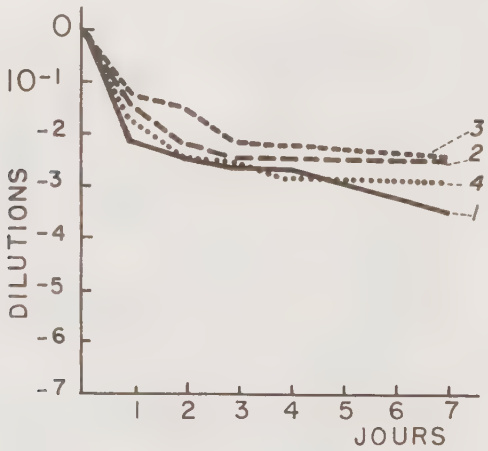
Lieu : Bordelais - Date : 6 Mai 1960.
Type de sol : anciennement terre de vignoble. Remise en culture.
Profondeur : 5-10 cm.
Humidité : 42 ‰.
Matière organique : 44 ‰.
C : 0,8 % - N : 0,112 % - C/N : 7 - Humus : 0,276 %.
Microflore totale : Milieu liquide : 30.000 g/g.
Milieu solide : 25.000 g/g.
Fixation aérobie de l'N : 0
anaérobie de l'N : 0
Nitrification : nitreux : 0
nitriques : 0
Protéolyse = 9.500 g/g. - Voir courbe.
Dénitrification = 250 g/g. - Voir courbe.
Cellulolyse : aérobie : 0
anaérobie : 0
Amylolyse = 450 g/g. - Voir courbe.
Réduction de SO_4 = 0.



DÉSIGNATION DU PRÉLÈVEMENT

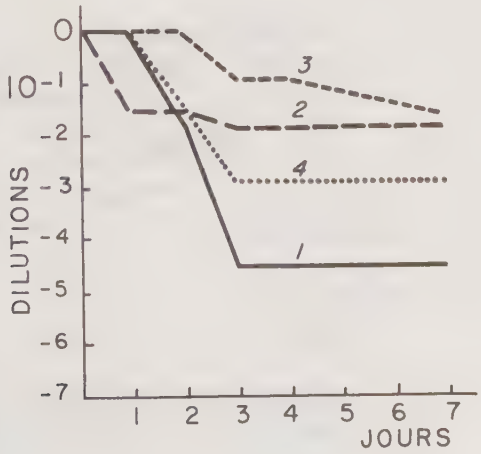
FRANCE - F_c

Lieu : Ferme de Grignon (S. & O.) - Date : 10 Décembre 195
Type de prélèvement : fumier de cheval peu consommé.
Humidité : 38 ‰.
Matière organique : 796 ‰.
C : 36 % - N : 1,54 % - C/N : 23 - Humus : 1,290 %.
Microflore totale : Milieu liquide : 10.000 g/g.
Milieu solide : 8.800 g/g.
Fixation aérobie de l'N : 0
anaérobie de l'N : 0
Nitrification : nitreux : 0
nitriques : 0
Protéolyse = 2.500 g/g. - Voir courbe.
Dénitrification = 250 g/g. - Voir courbe.
Cellulolyse : aérobie = ++ à 1/2
anaérobie = +++ à 1/64.
Hémicellulolyse = 950 g/g. - Voir courbe.
Amylolyse = 250 g/g. - Voir courbe.
Réduction de SO_4 = +++ à la dilution 1/32.



DÉSIGNATION DU PRÉLÈVEMENT
FRANCE - L

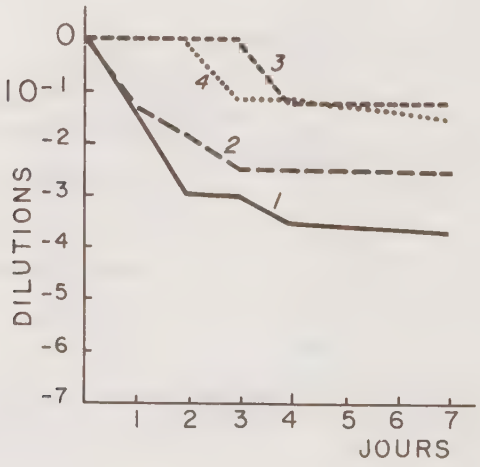
Lieu : Laniel (H^te-Loire) - Date : 9 Janvier 1956.
Type de sol : prairie.
Profondeur : 5-10 cm.
Humidité : 51 %.
Matière organique : 86 %.
C : 1,9 % - N : 0,280 % - C/N : 6,7 - Humus : 0,270 %.
Microflore totale : Milieu liquide : 10.000 g/g.
Milieu solide : 4.300 g/g.
Fixation aérobie de l'N : 0
anaérobie de l'N : 0
Nitrification : nitreux : 0
nitriques : 0
Protéolyse = 2.500 g/g. - Voir courbe.
Dénitrification = 25 g/g. - Voir courbe.
Cellulolyse = aérobie : 0
anaérobie : ++ à 1/2.
Hémicellulolyse = 250 g/g. - Voir courbe.
Amylolyse = 45 g/g.
Réduction de SO_4 : + à 1/16.



DÉSIGNATION DU PRÉLÈVEMENT

FRANCE - A_3

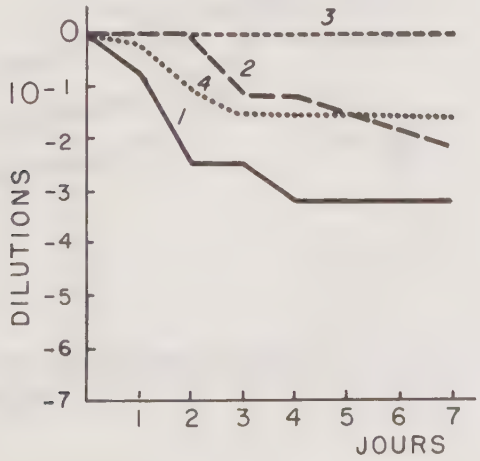
Lieu : Rambouillet (S. & O.) - Date : 12 Décembre 1955.
Type de sol : tourbe acide à Sphaignes.
Profondeur : 5-10 cm.
C : 6,9 % - N : 0,5 % - C/N : 13,8.
Microflore totale : Milieu liquide : 7.000 g/g.
Milieu solide : 11.000 g/g.
Fixation aérobie de l'N : 0
anaérobie de l'N : 0
Nitrification : nitreux : 0
nitriques : 0
Protéolyse = 4.500 g/g. - Voir courbe.
Dénitrification = 25 g/g. - Voir courbe.
Cellulolyse : aérobie = 0
anaérobie = 0
Hémicellulolyse = 25 g/g. - Voir courbe.
Amylolyse = 250 g/g. - Voir courbe.
Réduction de SO_4 = 0.



DÉSIGNATION DU PRÉLÈVEMENT

FRANCE - E

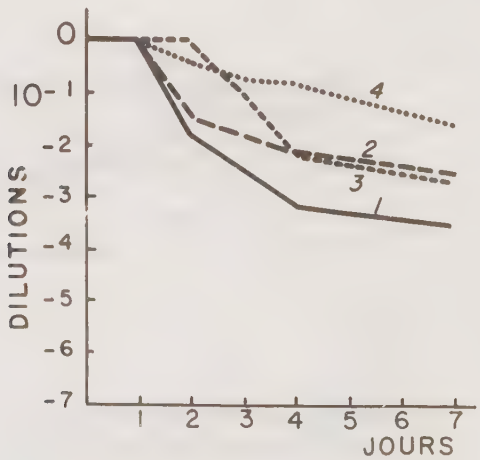
Lieu : Estérel - Date : 25 Janvier 1956.
Type de sol : vignoble.
Profondeur : 5-10 cm.
Humidité : 12 %.
Matière organique : 32 %.
C : 0,45 % - N : 0,06 % - C/N : 7,5 - Humus : 0,015 %.
Microflore totale : Milieu liquide : 2.600 g/g.
Milieu solide : 300 g/g.
Fixation aérobie de l'N : 0
anaérobie de l'N : 0
Nitrification : nitreux : 0
nitriques : 0
Protéolyse = 950 g/g. - Voir courbe.
Dénitrification = 0 g/g.
Cellulolyse : aérobie = 0
anaérobie = 0
Hémicellulolyse = 25 g/g. - Voir courbe.
Amylolyse = 250 g/g. - Voir courbe.
Réduction de SO_4 = 0.



DÉSIGNATION DU PRÉLÈVEMENT

FRANCE - Sc

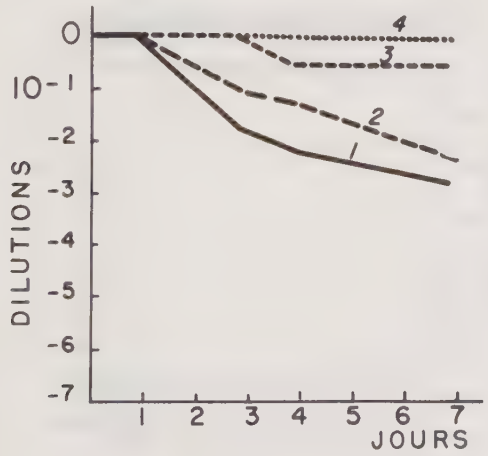
Lieu : Châteaufort (S. & O.) - Date : 25 Juin 1956.
Type de sol : sable.
Profondeur : 5-10 cm.
Humidité : 3 ‰.
Matière organique : 17 ‰.
C : 0,12 % - N : 0,01 % - C/N : 12 - Humus : 0,02 %.
Microflore totale : Milieu liquide : 2.600 g/g.
Milieu solide : 13.000 g/g.
Fixation aérobie de l'N = 0
anaérobie de l'N = 0
Nitrification : nitreux : 0
nitriques : 0
Protéolyse = 2.500 g/g. - Voir courbe.
Dénitrification = 150 g/g. - Voir courbe.
Cellulolyse : aérobie = 0
anaérobie = 0
Hémicellulolyse = 250 g/g. - Voir courbe.
Amylolyse = 150 g/g. - Voir courbe.
Réduction de SO_4 = 0.



DÉSIGNATION DU PRÉLÈVEMENT

FRANCE - C P

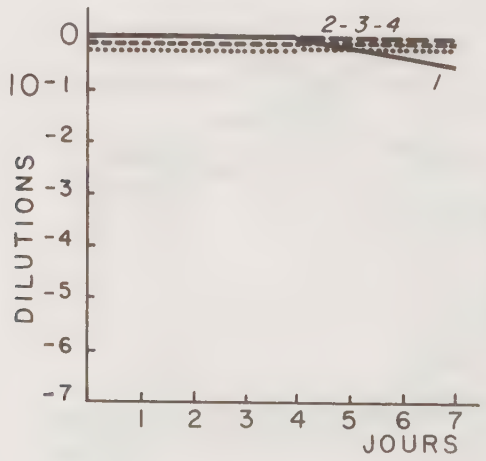
Lieu : Parentis (Landes) - Date : 7 Décembre 1956.
Type de sol : "Carotte" de puits de pétrole.
Humidité : 3,5 ‰.
Matière organique : 32 ‰.
C : 0,2 % - N : 0,035 % - C/N : 5,7 - Humus : 0,02 %.
Microflore totale : Milieu liquide : 600 g/g.
Milieu solide : 200 g/g.
Fixation aérobie de l'N : 0
anaérobie de l'N : 0
Nitrification : nitreux : 0
nitriques : 0
Protéolyse = 400 g/g. - Voir courbe.
Dénitrification = 2 g/g. - Voir courbe.
Cellulolyse : aérobie : 0
anaérobie : 0
Hémicellulolyse : 0.
Amylolyse = 25 g/g. - Voir courbe.
Réduction de SO_4 = 0.



DÉSIGNATION DU PRÉLÈVEMENT

FRANCE - S G C

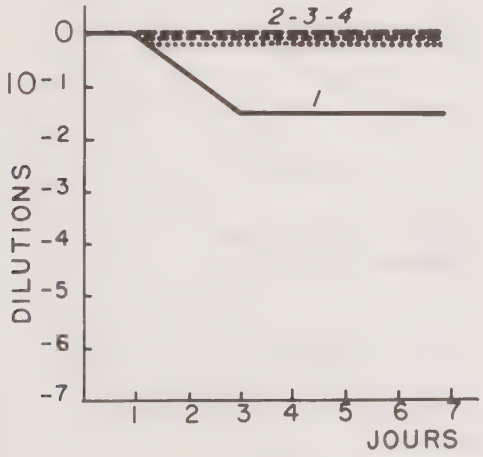
Lieu : Royan (Ch^{te} M^{me}) - Date : 15 Octobre 1956.
Type de sol : sable bord de mer.
Profondeur : 5 cm.
Humidité : 2,5 ‰.
Matière organique : 14 ‰.
C : 0,03 % - N : 0,007 % - C/N : 4,3 - Humus : 0,08 %.
Microflore totale : Milieu liquide : 160 g/g.
Milieu solide : pas de colonies à 10^{-2}.
Fixation aérobie de l'N : 0
anaérobie de l'N : 0
Nitrification : nitreux : 0
nitriques : 0
Protéolyse = 3 g/g. - Voir courbe.
Dénitrification = 0
Cellulolyse : aérobie = 0
anaérobie = 0
Hémicellulolyse = 0
Amylolyse = 0
Réduction de SO_4 = 0



DÉSIGNATION DU PRÉLÈVEMENT

FRANCE - A1

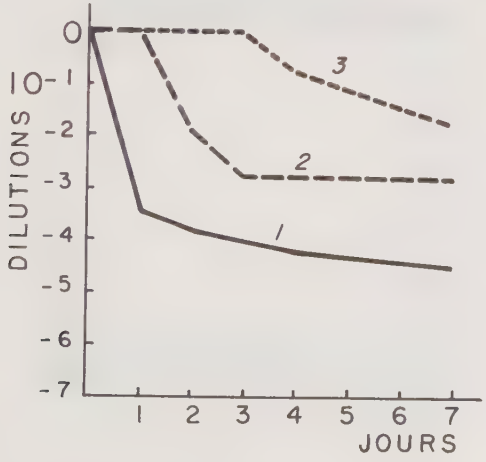
Lieu : Arcachon (Gironde) - Date : 7 Décembre 1956.
Type de sol : Alios.
Végétation : pins des Landes.
Profondeur : 5-10 cm.
Humidité : 5,5 ‰.
Matière organique : 29 ‰.
C : 0,9 % - N : 0,1 % - C/N : 9 - Humus : 0,04 %.
Microflore totale : Milieu liquide : 8 g/g.
Milieu solide : 0
Fixation aérobie de l'N : 0
anaérobie de l'N : 0
Nitrification : nitreux : 0
nitriques : 0
Protéolyse = 25 g/g. - Voir courbe.
Dénitrification : 0.
Cellulolyse : aérobie = 0
anaérobie = 0
Hémicellulolyse = 0.
Amylolyse = 0.
Réduction de SO_4 = 0.



PRÉLÈVEMENTS PROVENANT DU SAHARA

DÉSIGNATION DU PRÉLÈVEMENT
SAHARA - EA_I

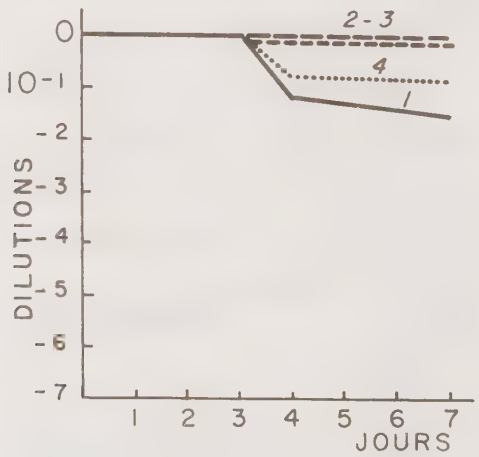
Lieu : El Arfiane - Date : 29 Mars 1960.
Type de sol : Echantillon de sol irrigué en bord d'un drain à la plantation.
Profondeur : 25 cm.
Humidité : 22,3 ‰.
Matière organique : 64 ‰.
C : 0,25 % - N : 0,042 % - C/N : 5,7 - Humus : 0,06 %.
Microflore totale : Milieu liquide : 130.000 g/g.
Milieu solide : 101.000 g/g.
Fixation aérobie de l'N : 0
anaérobie de l'N : 0
Nitrification : nitreux : 0
nitriques : 0
Protéolyse = 25.000 g/g. - Voir courbe.
Dénitrification = 45 g/g. - Voir courbe.
Cellulolyse : aérobie : + à 1/32.
anaérobie : ++ à 1/64.
Amylolyse = 450 g/g. - Voir courbe.
Réduction de SO_4 = ++ à 10^{-1}.



DÉSIGNATION DU PRÉLÈVEMENT

SAHARA - S N° 2

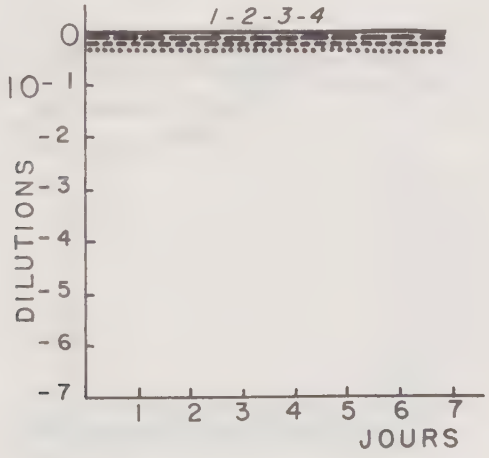
Lieu : Beni-Ounif - Date : Janvier 1957.
Type de sol : Hamada.
Profondeur : 5 cm.
Humidité : 3,2 ‰.
Matière organique : 25 ‰.
C : 0,12 % - N : 0,07 % - C/N : 1,7 - Humus : 0,01 % (négligeable)
Microflore totale : Milieu liquide : 275 g/g.
Milieu solide : 9.100 g/g.
Fixation aérobie de l'N : 0
anaérobie de l'N : 0
Nitrification : nitreux : 0
nitriques : 0
Protéolyse = 25 environ g/g. - Voir courbe.
Dénitrification : 0
Cellulolyse aérobie : 0
anaérobie : 0
Hémicellulolyse = 60 g/g. - Voir courbe.
Amylolyse : 0.
Réduction de SO_4 = 0.



DÉSIGNATION DU PRÉLÈVEMENT

SAHARA - S N° 3

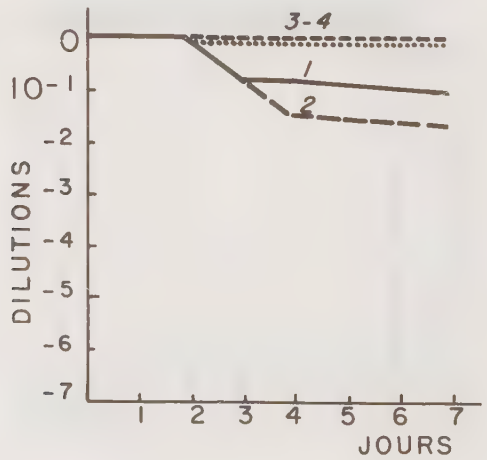
Lieu : Beni-Ounif - Date : 21 Janvier 1957.
Type de sol : Daïa.
Profondeur : 5 cm.
Humidité : 14 ‰.
Matière organique : 55 ‰.
C : 0,15 % - N : 0,03 % - C/N : 5 - Humus : moins de 0,01 %.
Microflore totale : Milieu liquide : 100 g/g.
Milieu solide : 100 g/g.
Fixation aérobie de l'N : 0
anaérobie de l'N : 0
Nitrification : nitreux : 0
nitriques : 0
Protéolyse = 0
Dénitrification = 0
Cellulolyse : aérobie : 0
anaérobie : 0
Hémicellulolyse = 0
Amylolyse = 0
Réduction de SO_4 = 0



DÉSIGNATION DU PRÉLÈVEMENT

SAHARA - S N° 4

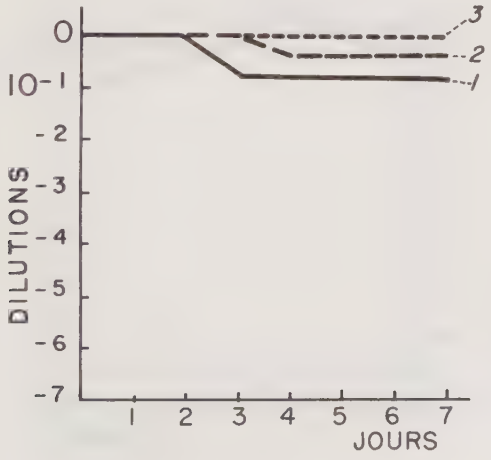
Lieu : Région de Beni-Ounif - Date : 21 Janvier 1957.
Type de sol : Oued.
Profondeur : 5 cm.
Humidité : 1,5 ‰.
Matière organique : 16 ‰.
C : 0,1 % - N : 0,07 % - C/N : 1,4 - Humus : 0,01 %.
Microflore totale : Milieu liquide : 100 g/g.
Milieu solide : 100 g/g.
Fixation aérobie de l'N : 0
anaérobie de l'N : 0
Nitrification : nitreux : 0
nitriques : 0
Protéolyse = 9 g/g. - Voir courbe.
Dénitrification = 0.
Cellulolyse : aérobie : 0
anaérobie : 0
Hémicellulolyse = 0
Amylolyse = 45 g/g. - Voir courbe.
Réduction de SO_4 : 0.



DÉSIGNATION DU PRÉLÈVEMENT

SAHARA - O_{II}

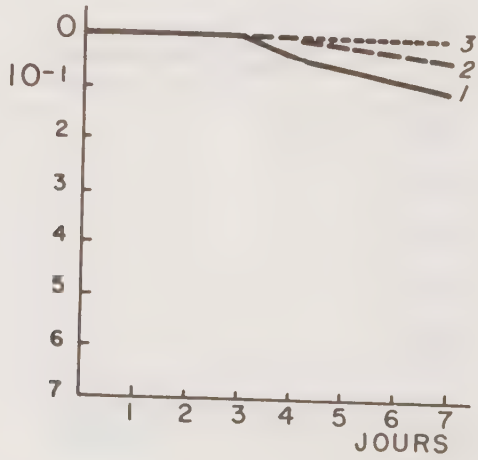
Lieu : Ouargla - Date : 9 Mai 1960.
Type de sol : sol non irrigué.
Végétation : Agga.
Profondeur : 20 cm.
Humidité : 8 ‰.
Matière organique : 30 ‰.
C : 0,03 % - N : 0,01 % - C/N : 3 - Humus : moins de 0,01 %.
Microflore totale : Milieu liquide : 80 g/g.
Milieu solide : 30 g/g.
Fixation aérobie de l'N : 0
anaérobie de l'N : 0
Nitrification : nitreux : 0
nitriques : 0
Protéolyse = 9 g/g. - Voir courbe.
Dénitrification = 0.
Cellulolyse : aérobie : 0
anaérobie : 0
Amylolyse = 3 g/g. - Voir courbe.
Réduction de SO_4 = + à 10^{-1}.



DÉSIGNATION DU PRÉLÈVEMENT

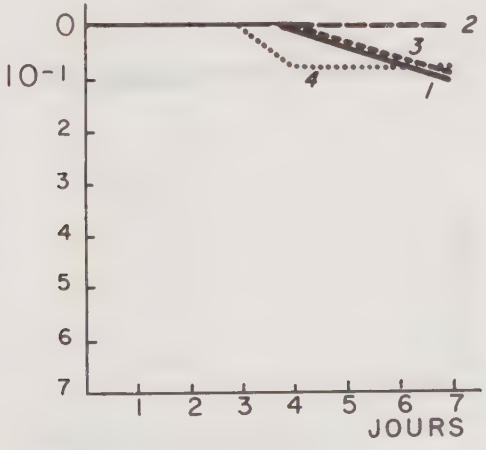
SAHARA - E A_{II}

Lieu : El Arfiane - Date : 21 Mars 1960.
Type de sol : sol non irrigué hors de la palmeraie. Sol nu sans végétation.
Profondeur : 25 cm.
Humidité : 20,3 ‰.
Matière organique : 60 ‰.
C : 0,10 % - N : 0,028 % - C/N : 3,6 - Humus : moins de 0,01 %.
Microflore totale : Milieu liquide : 50 g/g.
Milieu solide : 23 g/g.
Fixation aérobie de l'N : 0
anaérobie de l'N : 0
Nitrification : nitreux : 0
nitriques : 0
Protéolyse = 6 g/g. - Voir courbe.
Dénitrification = 0
Cellulolyse = aérobie = 0
anaérobie = 0
Amylolyse = 3 g/g. - Voir courbe.
Réduction de SO_4 = 0.



DÉSIGNATION DU PRÉLÈVEMENT
SAHARA - S N° 1

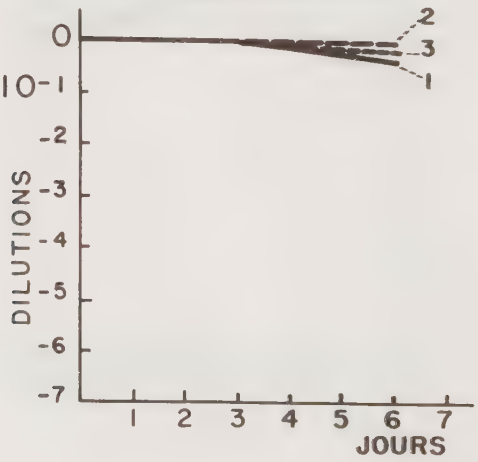
Lieu : Beni-Ounif - Date : 14 Janvier 1957.
Type de sol : Dune du Sahara.
Profondeur : 5 cm.
Humidité : 4 ‰.
Matière organique : 13,5 ‰.
C : 0,09 % - N : 0,01 % - C/N : 9 - Humus : 0,142 ‰.
Microflore totale : Milieu liquide : 50 g/g.
Milieu solide : 600 g/g.
Fixation aérobie de l'N : 0
anaérobie de l'N : 0
Nitrification : nitreux : 0
nitriques : 0
Protéolyse = 3 g/g. - Voir courbe.
Dénitrification = 4 g/g. - Voir courbe.
Cellulolyse aérobie = 0
anaérobie = 0
Hémicellulolyse = 6 g/g. - Voir courbe.
Amylolyse = 0 g/g.
Réduction de SO_4 = 0



DÉSIGNATION DU PRÉLÈVEMENT

SAHARA - E A_{III}

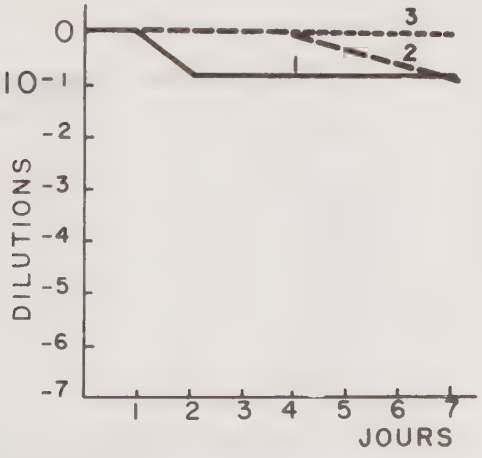
Lieu : El Arfiane - Date : 29 Mars 1960.
Type de sol : sol nu sans végétation hors de la palmeraie.
Non irrigué.
Profondeur : 25 cm.
Humidité : 16,8 ‰.
Matière organique : 58 ‰.
C : 0,049 % - N : 0,025 % - C/N : 1,9 - Humus : moins de 0,01 %
Microflore totale : Milieu liquide : 35 g/g.
Milieu solide : 26 g/g.
Fixation aérobie de l'N : 0
anaérobie de l'N : 0
Nitrification : nitreux : 0
nitriques : 0
Protéolyse = 4 g/g. - Voir courbe.
Dénitrification = 0
Cellulolyse : aérobie = 0
anaérobie = 0
Amylolyse = 0
Réduction de SO_4 = 0



DÉSIGNATION DU PRÉLÈVEMENT

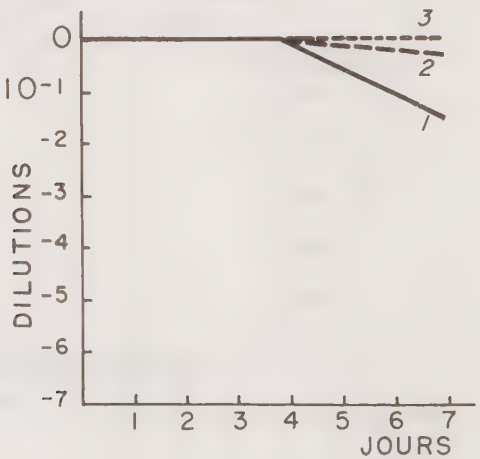
SAHARA - O_{III}

Lieu : Ouargla - Date : 9 Mai 1960.
Type de sol : sol sans végétaux.
Profondeur : 20 cm.
Humidité : 12 ‰.
Matière organique : 91 ‰.
C : 0,074 % - N : 0,01 % - C/N : 7 - Humus : moins de 0,01 %.
Microflore totale : Milieu liquide : 35 g/g.
Milieu solide : 20 g/g.
Fixation aérobie de l'N : 0
anaérobie de l'N : 0
Nitrification : nitreux : 0
nitriques : 0
Protéolyse : 4 g/g. - Voir courbe.
Dénitrification = 0
Cellulolyse : aérobie = 0
anaérobie = 0
Amylolyse = 3 g/g. - Voir courbe.
Réduction SO_4 : + à 10^{-1}.



DÉSIGNATION DU PRÉLÈVEMENT
SAHARA - O_I

Lieu : Ouargla - Date : 9 Mai 1960.
Type de sol : sol irrigué en culture de sorgho sur ancienne luzernière.
Profondeur : 20 cm.
Humidité : 25 ‰.
Matière organique : 91 ‰.
C : 0,074 % - N : 0,017 % - C/N : 4,2 - Humus : moins de 0,01
Microflore totale : Milieu liquide : 20 g/g.
Milieu solide : 40 g/g.
Fixation aérobie de l'N : 0
anaérobie de l'N : 0
Nitrification : nitreux : 0
nitriques : 0
Protéolyse = 25 g/g. - Voir courbe.
Dénitrification : 0
Cellulolyse : aérobie = 0
anaérobie = 0
Amylolyse = 4 g/g. - Voir courbe.
Réduction de SO_4 = + à 10^{-1}.



PRELÈVEMENTS PROVENANT D'AFRIQUE EQUATORIALE

DÉSIGNATION DU PRÉLÈVEMENT
AFRIQUE EQUATORIALE - Bz N° 7

Lieu : Vallée du Niari (entre Brazzaville et Pointe-Noire).

Date : 12 Octobre 1956.

Type de sol : terre du bord du fleuve prélevée un peu au-dessou
du niveau de l'eau.

Profondeur : 0,5 cm.

Humidité : 15 ‰.

Matière organique : 134 ‰.

C : 1,51 % - N : 0,122 % - C/N : 13 - Humus : 0,08 %.

Microflore totale : Milieu liquide : 70.000 g/g.
solide : 13.400 g/g.

Fixation aérobie de l'N : 0
anaérobie de l'N : 0

Nitrification : nitreux : 0
nitriques : 0

Protéolyse = 25.000 g/g. - Voir courbe.

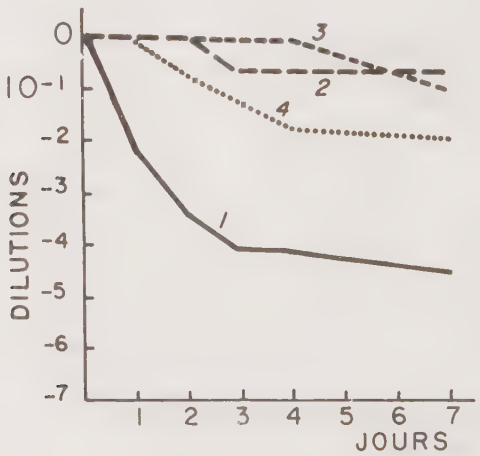
Dénitrification = 25 g/g. - Voir courbe.

Cellulolyse : aérobie = 0
anaérobie = 0

Hémicellulolyse = 60 g/g. - Voir courbe.

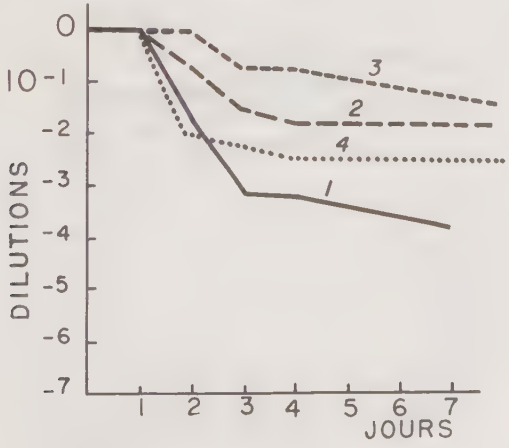
Amylolyse = 7 g/g. - Voir courbe.

Réduction de SO_4 = 0



DÉSIGNATION DU PRÉLÈVEMENT
AFRIQUE EQUATORIALE - Bz N° 1

Lieu : Vallée du Niari (entre Brazzaville et Pointe-Noire).
Date : 8 Octobre 1956.
Type de sol : terre en jachère anciennement cultivée. 1954. Arachides.
Profondeur : 5-10 cm.
Humidité : 8 ‰.
Matière organique : 116 ‰.
C : 1,23 % - N : 0,140 % - C/N : 8 - Humus : 0,07 %.
Microflore totale : Milieu liquide : 10.000 g/g.
Milieu solide : 400 g/g.
Fixation aérobie de l'N : 0
anaérobie de l'N : 0
Nitrification : nitreux : 0
nitriques : 0
Protéolyse = 4.500 g/g. - Voir courbe.
Dénitrification = 25 g/g. - Voir courbe.
Cellulolyse : aérobie = 0
anaérobie = 0
Hémicellulolyse = 25 g/g. - Voir courbe.
Amylolyse = 45 g/g. - Voir courbe.
Réduction de SO_4 = 0



DÉSIGNATION DU PRÉLÈVEMENT
AFRIQUE EQUATORIALE - Bz N° 6

Lieu : Vallée du Niari (entre Brazzaville et Pointe-Noire).

Date : 1er Octobre 1956.

Type de sol : terre de pâturage près du fleuve. Irriguée en période de crue.

Profondeur : 5 cm.

Humidité : 34 ‰.

Matière organique : 162,5 ‰.

C : 2,94 % - N : 0,410 % - C/N : 7 - Humus : 0,05 %.

Microflore totale : Milieu liquide : 2.200 g/g.
Milieu solide : 2.600 g/g.

Fixation aérobie de l'N : 0
anaérobie de l'N : 0

Nitrification : nitreux : 0
nitriques : 0

Protéolyse = 2.500 g/g. - Voir courbe.

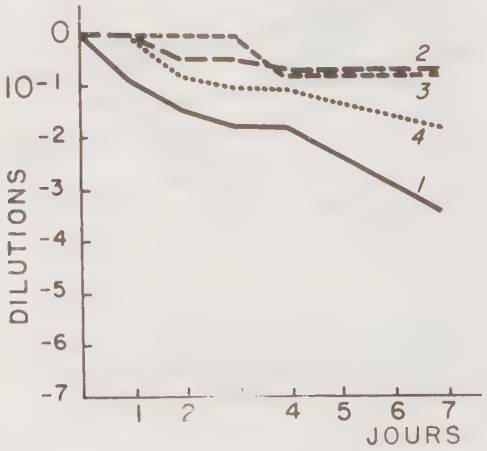
Dénitrification : 3 g/g. - Voir courbe.

Cellulolyse = aérobie : 0
anaérobie : 0

Hémicellulolyse = 25 g/g. - Voir courbe.

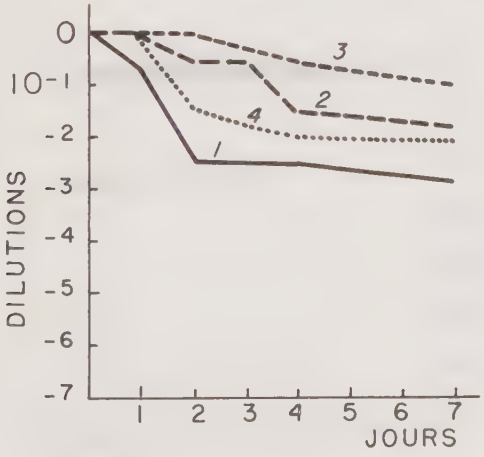
Amylolyse = 7 g/g. - Voir courbe.

Réduction de SO_4 = + à la dilution 1/4.



DÉSIGNATION DU PRÉLÈVEMENT
AFRIQUE EQUATORIALE - Bz N° 2

Lieu : Vallée du Niari (entre Brazzaville et Pointe-Noire).
Date : 8 Octobre 1956.
Type de sol : terre vierge.
Profondeur : 5-10 cm.
Humidité : 7 ‰.
Matière organique : 86,5 ‰.
C : 2,26 % - N : 0,160 % - C/N : 14 - Humus : 0,01 %.
Microflore totale : Milieu liquide : 1.600 g/g.
Milieu solide : 300 g/g.
Fixation : aérobie de l'N : 0
anaérobie de l'N : 0
Nitrification : nitreux : 0
nitriques : 0
Protéolyse = 950 g/g. - Voir courbe.
Dénitrification = 20 g/g.- Voir courbe.
Cellulolyse : aérobie = 0
anaérobie = 0
Hémicellulolyse = 60 g/g. - Voir courbe.
Amylolyse = 45 g/g. - Voir courbe.
Réduction de SO_4 = 0.



DÉSIGNATION DU PRÉLÈVEMENT
AFRIQUE EQUATORIALE - Bz N° 4

Lieu : Vallée du Niari (entre Brazzaville et Pointe-Noire).

Date : 10 Octobre 1956.

Type de sol : terre d'un champ d'arachides, 2e cycle de culture. 1955-1956.

Profondeur : 5 cm.

Humidité : 9,5 ‰.

Matière organique : 82 ‰.

C : 0,96 % - N : 0,10 % - C/N : 9,6 - Humus : 0,02 %.

Microflore totale : Milieu liquide : 1.000 g/g.
Milieu solide : 500 g/g.

Fixation aérobie de l'N : 0

anaérobie de l'N : 0

Nitrification : nitreux : 0

nitriques : 0

Protéolyse = 950 g/g. - Voir courbe.

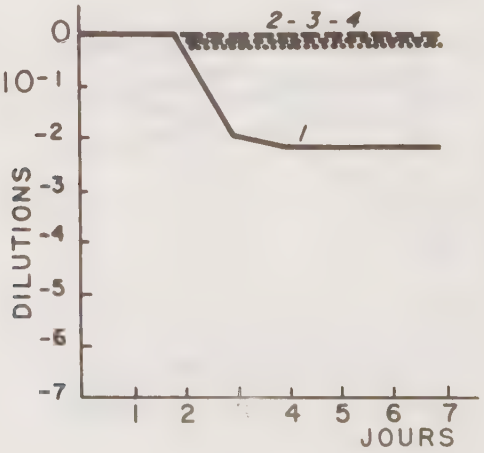
Dénitrification : 0

Cellulolyse : aérobie : 0
anaérobie : 0

Hémicellulolyse : 0

Amylolyse = 3 g/g. - Voir courbe.

Réduction de SO_4 : 0.

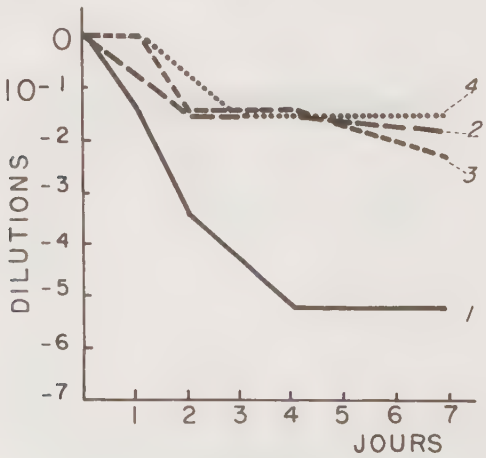


PRÉLÈVEMENT RECUEILLI EN EGYPTE

DÉSIGNATION DU PRÉLÈVEMENT

EGYPTE - N

Lieu : Vallée du Nil - Date : 20 Février 1956.
Type de sol : limon du Nil.
Profondeur : 5 cm.
Humidité : 60 ‰.
Matière organique : 92,5 ‰.
C : 0,9 % - N : 0,1 % - C/N : 9 - Humus : 0,036 %.
Microflore totale : Milieu liquide : 100.000 g/g.
Milieu solide : 1.150 g/g.
Fixation aérobie de l'N : 0
anaérobie de l'N : 0
Nitrification : nitreux : 0
nitriques : 0
Protéolyse = 95.000 g/g. - Voir courbe.
Dénitrification : 250 g/g. - Voir courbe.
Cellulolyse : aérobie : 0
anaérobie : + à 1/2
Hémicellulolyse = 25 g/g. - Voir courbe.
Amylolyse = 45 g/g. - Voir courbe.
Réduction de SO_4 = +++ à la dilution 1/32.

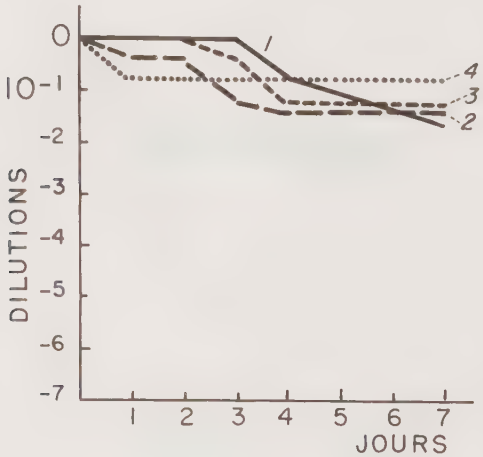


PRÉLÈVEMENT PROVENANT DE L'ANTARCTIQUE

DÉSIGNATION DU PRÉLÈVEMENT

ANTARCTIQUE - I P

Lieu : Ile des Pétrels - Date : 17 Juin 1957.
Humidité : 28 ‰.
Matière organique : 22,5 ‰.
C : 0,5 % - N : 0,126 % - C/N : 3,9 - Humus : 0,03 %.
Microflore totale : Milieu liquide : 50 g/g.
Milieu solide : 40 g/g.
Fixation aérobie de l'N : 0
anaérobie de l'N : 0
Nitrification : nitreux : 0
nitriques : 0
Protéolyse = 45 env. g/g. - Voir courbe.
Dénitrification = 90 g/g. - Voir courbe.
Cellulolyse : aérobie = 0
anaérobie = 0
Hémicellulolyse = 250 g/g. - Voir courbe.
Amylolyse = 9 g/g. - Voir courbe.
Réduction de SO_4^- = 0



C O N C L U S I O N S

Comme nous venons de le voir, les échantillons analysés orrespondent à des types de sols différents : terre de jardin, erre de prairie, terreau, boue de ruisseau, limon, sables, t à des prélèvements divers (fumier, carotte de puits de étrole, etc...). On peut déjà remarquer que ces terres ont té, les unes travaillées par l'homme donc fumées, tandis que 'autres ne l'ont pas été (sables du Sahara, par exemple) ; ue leur humidité, la quantité de matière organique qu'elles enferment, la végétation qui les recouvre, et la température xtérieure qu'elles subissent ne sont pas les mêmes ; leur empla- ement est très différent (15 échantillons ont été prélevés en rance en des lieux éloignés, 5 en Afrique Equatoriale, et 1 n Egypte ; le dernier provient de l'Antarctique).

Le choix des terres et cette variété de conditions nous ermettront d'avoir une vue d'ensemble sur les problèmes éco- giques si particuliers des thermophiles.

Des nombreux renseignements que nous pouvons tirer des iches signalétiques que nous venons de passer en revue, nous llons déduire un certain nombre de conclusions qui feront

l'objet de la troisième partie de notre travail. Ces conclusions nous amèneront à préciser les connaissances actuelles sur l'écologie générale des thermophiles, c'est-à-dire aussi bien sur les facteurs de répartition de ces micro-organismes que sur l'existence parmi eux de nombreux groupements fonctionnels.

Le dépouillement de ces fiches nous permettra également dans une quatrième partie, de préciser quelques aspects de la morphologie et de la biologie de ces thermophiles.

TROISIÈME PARTIE

ECOLOGIE DES THERMOPHILES

TROISIÈME PARTIE

ECOLOGIE DES THERMOPHILES

Cette troisième partie, tirée du dépouillement des fic signalétiques et consacrée à l'écologie des bactéries thermo philes, comprend trois chapitres :

I- La répartition des Bactéries thermophiles et les facteurs de cette répartition.

II- L'écologie des groupements fonctionnels.

III- L'équilibre entre les thermophiles et les mésophile (équilibre étudié sous un aspect statique et dynamique).

C h a p i t r e I

RÉPARTITION DES THERMOPHILES ET FACTEURS DE RÉPARTITION.

Le problème important de la répartition de ces germes dans la nature nous amène à en considérer le mode de groupement et les facteurs qui en sont responsables ; ces chapitres sont particulièrement controversés.

Une évocation de la bibliographie permet rapidement de s'en rendre compte.

ES BIBLIOGRAPHIQUES -

De nombreuses recherches ont été faites pour étudier la répartition géographique des bactéries thermophiles et leur mode de groupement dans des sols différents.

MIQUEL (1879) fut le premier à isoler d'un sol de jardin un germe thermophile. GLOBIG (1880) obtint des germes cultivant à une température élevée, également à partir d'une terre de jardin. En 1903, TZIKLINSKAJA les retrouve dans les sols de l'Antarctique et DE KRUYFF (1909) en Afrique du Nord. Pour

NEGRE (1913), la répartition est la suivante : ces germes co
tuent la majeure partie de la flore du Sahara ; dans les ter
d'Afrique du Nord et de France, ils sont en proportions moin
importantes. Dans les régions polaires, il n'y a pas de the
philes et leur proportion, par rapport aux mésophiles, dimin
de l'Equateur au Pôle. Donc, pour NEGRE le facteur détermin
est la température. D'ailleurs, de nombreux chercheurs pens
que les thermophiles ne se rencontrent qu'en zone méridional
où l'insolation intense garantit les besoins en chaleur. Ce
laisse supposer que les sols méridionaux sont plus riches en
thermophiles que les sols des régions nordiques.

En 1919, BERGEY signale ces germes dans les sols d'Amé
que du Nord. MICHOUSTINE (1926-1944) remarque que les bacté
thermophiles sont souvent mises en évidence dans les sols cu
vés. Pour cet auteur, leur répartition est différente de ce
de NEGRE. Toutes les zones climatiques de l'Union Soviétiqu
ont été étudiées, de la toundra aux zones méridionales. Auc
relation n'est trouvée avec la température. Par contre, le
nombre de thermophiles augmente avec le type de culture. Le
sols de jachère en sont pauvres. L'étude des sols des régio
montagneuses du Caucase a montré qu'ils contiennent approxim
tivement la même quantité, insignifiante d'ailleurs, de ther
philes que les sols des plaines. Leur présence dans les sol
incultes peut être expliquée par l'apport de matières fécale
animales. Pour MICHOUSTINE, le facteur essentiel de réparti

est donc l'apport de fumier et le type de culture du sol. L'étude des terres cultivées a permis, en effet, d'établir une échelle caractérisant le degré de culture d'un sol en fonction de sa richesse en thermophiles. Dans un sol en jachère, un gramme de sol contient de 100 à 1.000 thermophiles ; dans les sols peu cultivés, de 100 à 50.000 ; dans les sols cultivés normalement, de 50 à 90.000, et dans les sols très cultivés, de 100 à 400.000. Les thermophiles apportés au sol et se développant à 60° varient peu numériquement dans le sol pendant la période de culture ; leur reproduction n'est pas exclue en période chaude de l'année, mais la concurrence de la microflore mésophile, mieux adaptée, déprime l'activité des thermophiles. En 1938, EGOROVA, étudiant les fonds de mer de l'Extrême-Nord, y montre la présence de thermophiles typiques. Enfin, OMCHENETSKY (1944) remarque que les bactéries thermophiles sont souvent mises en évidence dans les sols cultivés.

Si les auteurs sont à peu près d'accord pour affirmer l'ubiquité des bactéries thermophiles, ils ne le sont plus quant à leur fréquence de répartition et encore moins quant aux facteurs de cette répartition.

RESULTATS EXPÉRIMENTAUX -

Dans ces résultats expérimentaux, déduits de nos fiches signalétiques, nous indiquerons quelle est la répartition des thermophiles suivant le type de sol, suivant le climat et sui-

vant la profondeur ; nous y ajouterons le rôle de l'humidité et de la teneur en matière organique et celui de la fumure.

1)- Répartition des thermophiles suivant le type de sol -

Comme nous pouvons apporter un élément quantitatif, il nous est possible de classer nos prélèvements en fonction de leur richesse en bactéries thermophiles.

Ce classement permet de remarquer qu'entre les échantillons très riches comme le terreau (140.000.000 de germes par gramme) et des échantillons comme les sables où les numérations mettent en évidence un nombre extrêmement faible de germes (environ 50 par gramme et même moins), nous avons toute une gamme de répartition.

Mais il est possible de diviser cette gamme de répartition en trois groupes séparés chacun par une discontinuité assez marquée. Il existe ainsi un premier groupe qui comprend les sols renfermant de 500.000 à 140.000.000 de bactéries thermophiles ; un second groupe correspondant aux sols qui contiennent de 130.000 à 1.000 bactéries thermophiles ; enfin, un troisième groupe, le plus pauvre en bactéries thermophiles, est caractérisé par des chiffres inférieurs à 1.000.

Dans le tableau N° 1 situé ci-dessous, nous regrouperons comme nous venons de l'indiquer, les sols suivant leur richesse en bactéries thermophiles en trois groupes de la manière suivante :

a)- sols renfermant plus de 100.000 bactéries thermophiles,

b)- sols renfermant de 1.000 à 100.000 bactéries thermophiles (nous faisons remarquer au passage que nous plaçons dans cette catégorie de sols EA_I que l'on ne peut logiquement séparer des autres sols de cette catégorie et qui s'éloigne, au contraire, des sols du premier groupe) ;

c)- sols qui renferment moins de 1.000 bactéries thermophiles.

TABLEAU N° I Ecologie générale des Bactéries Thermophiles

Origine des Prélèvements	Plus de 100.000 Bactéries / g.		Mat. org. %	C %	N %	C/N	Humus %
Terreau (S. & O.)	TSC	140.000.000	31,2	10,5	0,67	15	0,685
Terreau (Paris)	TP	35.000.000	38,3	9,2	1,1	8,3	0,816
Terre de jachère (S. & O.)	G	1.900.000	8,3	3	0,350	8,8	0,204
Fumier de vaches (S. & O.)	Fv	1.600.000	75	23	1,19	19	0,01
Terre de jardin (Charente)	IR	700.000	8,3	1,2	0,266	4,6	0,193
Boue de ruisseau (S. & O.)	Bc	500.000	7,5	1,2	0,16	7,5	0,140
	De 100.000 à 1.000 Bactéries / g.						
Plantation (Sahara)	EA_I	130.000	6,40	0,243	0,042	5,7	négligeable
Limon (Egypte)	N	100.000	9,25	0,9	0,1	9	0,036
Vallée du Niari (Afrique Equatoriale)	Bz N° 7	70.000	13,4	1,59	0,12	13	0,08
Vignoble remis en culture (Gironde)	S_B	30.000	4,4	0,8	0,112	7	0,276
Fumier de cheval (S. & O.)	Fe	10.000	79,6	36	1,54	23	1,290
Terre en jachère (Afrique Equatoriale)	Bz N° 1	10.000	11,6	1,23	0,140	8	0,07
Prairie (Hte Loire)	L	10.000	8,6	1,9	0,280	6,7	0,27
Tourbière (S. & O.)	A_3	7.000	-	6,9	0,5	13,8	-
Terre de vignoble (Esterel)	E	2.600	3,2	0,45	0,06	7,5	0,015
Sable (S. & O.)	So	2.600	1,7	0,12	0,01	12	0,02
Terre de pâturage (Afrique Equatoriale)	Bz N° 6	2.200	16,2	2,94	0,410	7	0,05
Terre vierge (Afrique Equatoriale)	Bz N° 2	1.600	8,6	2,26	0,160	14	0,01
Champ d'arachides (Afrique Equatoriale)	Bz N° 4	1.000	8,2	0,96	0,10	9,6	0,02
	Moins de 1.000 Bactéries / g.						
Carotte de puits de pétrole (Landes)	CP	Environ 600	3,2	0,2	0,035	5,7	0,02
Hamada (Sahara)	S N° 2	275	2,5	0,12	0,07	1,7	- de 0,01
Sable (Chte Maritime)	SG_c	160	1,4	0,03	0,007	4,3	0,08
Daïa (Sahara)	S N° 3	100	5,5	0,15	0,03	5	- de 0,01
Oued (Sahara)	S N° 4	100	1,6	0,1	0,07	1,4	"
Sol non irrigué (Sahara)	O_{II}	80	3,0	0,03	0,01	3	"
Sol de l'Ile des Pétrels (Antarctique)	IP	50	2,25	0,5	0,126	3,9	"
Sol non irrigué (Sahara)	EA_{II}	50	6,0	0,10	0,028	3,6	"
Dune (Sahara)	S N° 1	50	1,35	0,09	0,01	9	0,142
Sol sans végétation (Sahara)	EA_{III}	35	5,8	0,049	0,025	1,9	- de 0,01
Sol sans végétation (Sahara)	O_{III}	20	9,1	0,074	0,01	7	"

Du tableau N° 1, nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

a)- Dans la première catégorie qui correspond aux échantillons les plus riches se trouvent des sols comme les terreaux, le fumier, la terre de jardin, etc... Une remarque s'impose donc : les sols bien fumés et régulièrement cultivés sont riches en bactéries thermophiles.

b)- Dans la deuxième catégorie, comprenant des échantillons moins riches en bactéries thermophiles, nous trouvons des terres de prairie de France ou d'Afrique Equatoriale, ou même des terres cultivées d'Afrique.

c)- Enfin, dans la dernière catégorie, nous avons réuni les sols pauvres en bactéries thermophiles. Nous constatons d'ailleurs que, dans cette catégorie, nous avons surtout des sables, que ceux-ci proviennent de France ou du Sahara.

Répartition suivant le climat -

Nous répartirons maintenant, dans le Tableau N° 2 ci-dessous, les bactéries en fonction du climat.

TABLEAU N° 2

Répartition des bactéries thermophiles en fonction du climat

	Origine des échantillons	Echantillons	Nombre de germes
Climat tempéré	Terreau (S. & O.)	T S c	140.000.000
	Terreau (Paris)	T P	35.000.000
	Terre en jachère (S. & O.)	G	1.900.000
	Fumier de vaches (S. & O.)	F v	1.600.000
	Terre de jardin (Charente)	L R	700.000
	Boue de ruisseau (S. & O.)	B c	500.000
	Vignoble remis en culture (Gironde)	S B	30.000
	Fumier de cheval (S. & O.)	F c	10.000
	Prairie (Hte Loire)	L	10.000
	Tourbière (S. & O.)	A3	7.000
	Terre de vignoble (Esterel)	E	2.600
	Sable (S. & O.)	S c	2.600
	Carotte de puits de pétrole (Landes)	C P	600
	Sable (Charente-Maritime)	S G c	160 env.
	Sable (alios des Landes)	Al	8
Climat équatorial	Limon de fleuve (Afrique Equatoriale)	Bz N° 7	70.000
	Terre en jachère (Afrique Equatoriale)	" 1	10.000
	Terre de pâturage (Afrique Equatoriale)	" 6	2.200
	Terre vierge (Afrique Equatoriale)	" 2	1.600
	Champ d'arachides (Afrique Equatoriale)	" 4	1.000
Climat saharien	Plantation (Sahara)	E A I	130.000
	Hamada (Sahara)	S N° 2	275
	Daïa (Sahara)	N° 3	100
	Oued (Sahara)	N° 4	100
	Sol non irrigué (Sahara)	OII	80
	Sol non irrigué (Sahara)	E A_{II}	50 env.
	Dune (Sahara)	S N° 1	50
	Sol sans végétation (Sahara)	E A_{III}	35
	Sol sans végétation (Sahara)	O_{III}	35
	Culture de Sorgho (Sahara)	O_{I}	20
Climat polaire	Sol de l'Ile des Pétrels (Antarctique)	I P	50 env.

Ce tableau nous permet de tirer les conclusions suivantes :

- Les thermophiles se rencontrent partout : le facteur "climat" ne semble jouer aucun rôle. Les sables du Sahara ne sont pas plus riches en thermophiles que ceux de la région parisienne, ou ceux des côtes de France. Les échantillons de la région de Brazzaville renferment moins de germes que ceux de la région parisienne. Les climats chauds n'augmentent donc pas le nombre des thermophiles contrairement à l'opinion de nombreux auteurs.

- La température n'est pas le seul facteur climatique des pays chauds et il faudrait envisager l'action d'autres facteurs : l'humidité par exemple (que nous verrons p. 105). Cependant, si, tenant compte de ces remarques, nous recherchons le rôle de la température, nous constatons que pour nos régions les variations du nombre de germes vont de 140.000.000 à 8 germes par gramme d'échantillon, c'est-à-dire s'étalent sur un large éventail. Dans la région de Brazzaville, où la température est plus élevée, les écarts vont de 70.000 germes par gramme à 1.000 germes, et au Sanara de 130.000 germes par gramme à 20. Dans ces deux cas, les extrêmes sont plus rapprochés.

- Nous pouvons donc constater que les nombres maxima de germes sont moins élevés en climat chaud, équatorial ou saharien, qu'en climat tempéré. D'autre part, les écarts entre les extrêmes sont plus faibles en pays chauds qu'en pays tempérés. Ces écarts s'expliquent quand on sait que dans les

pays tempérés on rencontre les terres les mieux cultivées, donc les plus riches en bactéries thermophiles.

3)- Répartition suivant la profondeur -

Ces germes ne sont pas uniquement présents à la surfac du sol. Le tableau ci-dessous nous permet d'apprécier le no bre de germes en fonction de la profondeur du prélèvement.

TABLEAU N° 3

Echantillon LR (terre de jardin)

Profondeur	10 cm.	50 cm.	90 cm.
Nombre de germes par gramme	700.000	500.000	80.000

Nous constatons que les échantillons de terre prélevés à 10 ou 50 cm. de la surface donnent des résultats voisins ; il n'y a pas, à ces niveaux, de différences très nettes. A 90 cm., alors qu'on pouvait croire à leur disparition, nous avons encore des thermophiles en quantité nettement plus fai qu'en surface (80.000, soit environ 10 %), mais cependant re tivement importante. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les travaux de labour d'une part, la pluie et les vers d terre d'autre part, entraîneraient ces germes, ou leurs spor en profondeur.

Notons bien qu'il ne s'agit ici que de la terre arable et que nous n'apportons pas de résultats en ce qui concerne

horizons pédologiques des sols naturels différenciés.

Rôle de l'humidité -

Des remarques faites au cours de nos expériences nous ont conduite à examiner également le rôle de l'humidité.

L'expérience a été faite à l'aide d'un terreau fraîchement prélevé et du même terreau "ressuyé". Dans le premier cas, nous obtenons 7.000.000 de germes et 3.400.000 dans le second. Ce même terreau "ressuyé", conservé à la température du laboratoire, montre au cours des analyses successives (tous les trois mois pendant un an) une certaine stabilité dans sa richesse en micro-organismes.

En plus, le tableau N° 2 nous permet de faire certaines remarques concernant la répartition des bactéries thermophiles sous les climats saharien et équatorial. Le premier est un climat sec dans l'ensemble, le second est humide. Corrélativement, nous constatons des différences entre la richesse en bactéries thermophiles des différents échantillons : leur nombre est plus élevé en climat équatorial humide que sous le climat saharien sec. Une seule exception, qui cependant confirme notre hypothèse, EA_I, sable provenant du Sahara (El Arfiane), est relativement riche en micro-organismes thermophiles, mais il a été prélevé dans une plantation au bord d'un drain, ce qui montre encore une fois que l'humidité joue un rôle important.

5)- Répartition selon la teneur en matière organique -

Des prélèvements comme les sables riches en silice et pourvus de matière organique sont les plus pauvres en thermophiles alors que les terres de jardin et le terreau à haute teneur organique sont très riches (Voir Tableau N° 4).

TABLEAU N° 4

Echantillons	Mat. organiques en g. %	Nbre de ge
Terreau	383 ‰	17.500.
Terre de jardin G	83 -	1.900.
Terre de jardin LR 50	51 -	500.
Sable marin	14 -	env.
Sable saharien (oued Namous)	16 -	env.

La teneur en matière organique apparaît donc à premièr vue comme un fait influençant la répartition de ces germes.

6)- Rôle de la fumure -

Ce facteur est très important ; on le conçoit parce qu comme nous l'avons montré au paragraphe précédent, les sols riches en matière organique sont riches en thermophiles.

Par ailleurs, on admet que les thermophiles sont les germes essentiels des fumiers ; or, certains fumiers peu con més sont moins riches que le terreau. Ceci nous conduit à p ser que si les thermophiles sont apportés par les fumiers, l terre arable constitue un milieu favorable à leur développem

En général, la fumure augmente le nombre de germes thermophiles d'un sol. C'est ce qui ressort des numérations effectuées sur deux parcelles d'une même terre arable dont l'une est traitée spécialement par un terreau très actif et l'autre n'est pas traitée.

TABLEAU N° 5

Echantillons	Nombre de germes par gramme
Terreau de traitement	1.400.000
Parcelle non traitée	16.000
Parcelle traitée	700.000

LUSION -

Pour nous résumer, il ressort de nos numérations que la répartition des bactéries thermophiles dans les sols est fonction de la teneur en matière organique de ces derniers, de leur fumure (d'ailleurs en partie liée au fumier) et de l'humidité du sol.

Ainsi pensons-nous avoir départagé les opinions contradictoires de NEGRE et de KRUYFF d'une part, et de MICHOUSTINE d'autre part. Nous sommes très loin des assertions du premier, lesquelles sont complètement infirmées par nos numérations : la température n'a rien à voir avec la richesse d'un sol en thermophiles ; ce ne sont pas des germes à prédominance méridionale. Nous sommes beaucoup plus près de l'opi-

nion de MICHOUSTINE, qui admet que la richesse en thermophiles est liée à la culture du sol ; mais à des données assez vagues, nous apportons la précision de numérations effective Cependant, nous ne pouvons admettre complètement son gradien de répartition en fonction de la fertilité et l'état de cultre du sol, sinon dans la mesure où ces deux caractères sont eux-mêmes liés à la teneur en matière organique, ce qui n'es pas toujours vrai. De plus, nous avons montré que la répartition est fonction d'un facteur important : l'humidité, et d'un facteur secondaire : la profondeur.

Chapitre II

ECOLOGIE DES GROUPEMENTS FONCTIONNELS

Dans ce chapitre, nous allons étudier l'assimilation de l'azote moléculaire, le problème des thermophiles nitrificateurs, la protéolyse, l'amylolyse, les hémicellulolytiques et les cellulolytiques, enfin la réduction des sulfates, en fonction des différents types de sol. Les résultats sont donnés sur nos fiches signalétiques.

Si, parmi les thermophiles, les cellulolytiques sont les plus étudiés et les plus connus, d'autres activités peuvent être mises en évidence. MICHOUSTINE (1950), faisant le point de la question, cite des thermophiles appartenant à des groupements physiologiques différents : protéolytiques et ammonifiants, réduisant les sulfates et les nitrates, assimilant l'azote moléculaire, fermentant les glucides, hydrolysant la cellulose, décomposant les acides gras, etc... Mais ces faits sont loin d'être universellement admis et plusieurs de ces activités restent controversées.

A- DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES -

Pour l'assimilation de l'azote moléculaire, la question ne semble pas tranchée. PRINGSHEIM (1913) a montré que certaines bactéries thermophiles peuvent assimiler l'azote gazeu L'auteur avait obtenu une culture de bactéries sporulées fixant l'azote libre. Cette bactérie se cultivait sur milieu salin additionné d'une certaine quantité d'extrait de terre e d'un glucide. PRINGSHEIM a observé une fixation de 0,2 mg. d par gramme de sucre fermenté dans une culture faite à 61° C. Par contre, de KRUYFF (1909-1913) n'a pas réussi à isoler de fixateurs d'azote thermophiles dans les sols tropicaux. Ains cette question semble insuffisamment étudiée.

Le problème des thermophiles nitrificateurs n'est pas résolu non plus : CAMPBELL (1932) a décrit une bactérie thermophile : Nitrosobacillus thermophilus, oxydant l'ammoniac en nitrite. Cette bactérie fut isolée à partir d'un échantillon de terre ensemencé en milieu minéral, l'isolement se faisant à l'aide du micro-manipulateur. C'est un thermophile avec optimum thermique à 55°-60° et minimum à 40°. La quantité de nitrites accumulés dans le milieu est minime. Pour MICHOUSTI ce germe ne peut être considéré comme un nitrificateur typiqu les nitrificateurs autotrophes responsables du premier stade du processus ne peuvent se développer au-dessus de 50°.

De nombreuses bactéries thermophiles décomposent la cellulose ; ce processus qui présente un grand intérêt pratiq

a été très étudié.

Les thermophiles protéolytiques ont surtout retenu l'attention de MICHOUSTINE : ce sont des germes putrides cultivant sur milieux usuels tels que le milieu gélosé à base de viande et de peptone. Ces germes ont été mieux étudiés que les autres par l'auteur en raison de leur facilité de culture en donnant de grosses colonies.

Des auteurs ont établi que la capacité de protéolyse n'est pas constante et peut varier brusquement suivant la composition du milieu et d'autres facteurs.

Les thermophiles ammonificateurs n'ont guère fait l'objet de recherches pour eux-mêmes ; ils se comportent différemment envers la gélatine. Certains ont la propriété de la liquéfier ; la présence d'enzymes gélatinolytiques chez les ammonificateurs a été établie par divers auteurs (MORRISON et TANNER (1922), FEIRER (1927)).

Pour BLACK et TANNER (1928), de nombreux thermophiles réduisent les nitrates en nitrites. La réduction s'arrête fréquemment à ce stade, mais certains thermophiles continuent la réduction jusqu'à l'azote libre (AMBROZ (1913), BARDOU (1907)).

La connaissance des amylolytiques est rudimentaire ; plusieurs souches thermophiles ne cultivent pas sur pomme de terre, alors qu'elles hydrolysent l'amidon sur milieux protéinés. Ceci s'explique, pour MICHOUSTINE, par l'absence, dans la pomme de terre, de composés organiques azotés indispensables à

la culture. Quant aux glucides solubles, ils sont très fréquemment fermentés avec formation d'acides, mais la plupart des souches étudiées peuvent s'en passer en présence de peptones.

B- RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX -

Les techniques mises au point nous ont permis de mettre en évidence sur milieu électif la présence ou l'absence de tel ou tel groupement et, de plus, d'avoir une idée approximative du nombre de germes de chacun d'eux et de leur activité.

La synthèse des résultats donnés sur les fiches signalétiques de chaque échantillon nous amène aux conclusions suivantes :

1)- Fixation de l'azote -

En aérobiose, nous n'avons pu, au cours de nombreux essa obtenir la formation de voile sur le milieu électif.

Etant donné l'importance de la question, pour essayer de la trancher, nous avons ensemencé des milieux pour Azotobacter avec une terre provenant du Sénégal où l'on pouvait penser tro ver des fixateurs thermophiles, et nous avons constaté à 28° la culture des germes à la dilution 10^{-1} (voile et vérificatio microscopique). Les mêmes milieux ensemencés par le même échantillon, aux mêmes dilutions, après séjour à l'étuve à 45° et à 56°, ne donnent pas de voile. L'examen microscopique mon

tre seulement quelques rares formes d'Azotobacter provenant sans doute de la terre ensemencée mais n'ayant pas proliféré. L'échantillon de terre ayant été prélevé au Sénégal, il a subi des températures variant entre 50 et 60°. Nous pouvons donc penser qu'aux températures supérieures à 55° les Azotobacter ne se multiplient plus ; leur développement peut seulement se faire quand la température descend au-dessous de 30°. Cependant ils ne sont pas tués à 55° puisque leur multiplication se produit quand les conditions deviennent favorables ; ils sont vraisemblablement enkystés.

En anaérobiose, il nous est arrivé quelquefois d'obtenir un dégagement gazeux dans les cloches de Durham et d'observer dans le milieu de culture quelques bâtonnets sporulés dans les cultures de premier ensemencement ; mais le réensemencement en milieu neuf ne donne plus de culture.

Nous devons donc conclure à l'absence, dans les sols analysés, du groupement bactérien thermophile fixateur d'azote moléculaire.

rotéolyse -

L'attaque de la gélatine par les germes thermophiles est la fonction la plus importante et la plus répandue dans les échantillons analysés.

Nous la rencontrons dans toutes les terres à microflore totale thermophile élevée. Les dilutions limites atteintes par la protéolyse sont d'autant plus importantes (c'est-à-dire

plus près de 10^{-10}) que l'échantillon est riche en germes.

C'est ainsi que dans un terreau (TS C), sur 140.000.00 de germes, nous trouvons 95.000.000 de protéolytiques et la dilution 10^{-9} est atteinte dès le deuxième jour.

Dans les terreaux comme TP cette fonction intéresse 25.000.000 germes sur 35.000.000 et la dilution limite est atteinte également au deuxième jour.

Pour les terres riches, G (terre de jardin), par exemp ou LR (terre de jardin), ou N (limon), ou encore Bc (boue de ruisseau), la dilution de 10^{-5} est atteinte le deuxième jour Nous avons toujours une forte proportion de protéolytiques (950.000 germes sur 1.900.000 pour G).

Parallèlement au nombre de germes, cette activité dimi dans les terres de prairie comme L, où nous avons seulement 2.500 germes protéolytiques sur 10.000. La dilution limite atteinte au troisième jour.

Enfin, nous constatons que cette fonction disparaît da les terres excessivement pauvres en germes thermophiles, te desséchées en général comme EA_{III}, S_3 et SGC, les deux premi res étant des sables non irrigués du Sahara, et SGC un sable des côtes de France. La protéolyse est la seule fonction mi en évidence dans O_I, O_{II} et O_{III}, échantillons prélevés à Ouargla au Sahara, et elle atteint à peine la dilution 10^{-1}

Quel que soit le nombre de germes, leur activité est jours très grande : le tracé des courbes de protéolyse mont

la très grande vitesse de ce processus, le plus souvent en deux jours, jamais plus de quatre jours.

La nitrification -

C'est une fonction que nous n'avons pu mettre en évidence, même dans les sols très riches en thermophiles. Nous n'avons pu obtenir la formation de nitrates ni même de nitrites ; d'ailleurs, pour WAKSMAN, le phénomène de nitrification est inhibé dès 40°, qu'il s'agisse de la nitritation (Nitrosomonas) ou de la nitratation (Nitrobacter).

La dénitrification -

Cette fonction est très largement répandue, mais moins que la protéolyse ; nous la rencontrons surtout dans les terres riches en germes thermophiles.

Dans un échantillon, TSC par exemple (terreau), où nous avons 140.000.000 de germes, 950.000 seulement accomplissent cette fonction alors que 95.000.000 sont protéolytiques (c'est-à-dire 100 fois plus). La dilution 10^{-7} est atteinte au septième jour ; pour TP (terreau également), 450.000 germes/g. sont dénitrifiants sur 35.000.000 de germes totaux.

Dans les échantillons moins riches, comme G (jachère), nous ne trouvons que 25.000 germes dénitrifiants sur 1.900.000, et dans une boue (Bc) 9.500 sur 500.000 au total ; les dilutions limites sont atteintes en 4 jours.

Dans un très grand nombre d'échantillons, cette fonction

n'est que faiblement représentée. N qui est un limon donne 250 germes dénitrifiants sur 100.000, et la dilution limite n' est atteinte qu'en 7 jours.

Enfin, nous n'avons pu mettre en évidence cette fonctio dans de nombreux cas où les germes protéolytiques sont, eux, encore présents : SG_c, $O_{I\ II}$ et $_{III}$, S n°2, S n°3, EA_{II}, EA_{III} Al, etc..., toutes terres à microflore totale thermophile pauvre et de type voisin, puisque nous avons des sables de côtes de France (SG_c et Al) ou des sables du Sahara (SG_c, $O_{I\ II}$ et $_I$ S n°2, S n°3, EA_{II} et III).

En conclusion, les dénitrifiants apparaissent comme asse bien représentés parmi les thermophiles, mais cependant moins répandus, moins nombreux que les protéolytiques, là où ils son présents ; ils sont aussi moins actifs et disparaissent dans certains échantillons.

5)- L'amylolyse -

Les germes attaquant l'amidon sont nombreux parmi les thermophiles. Leur nombre est moins élevé que celui des protéolytiques, mais dans les échantillons riches en thermophiles il varie parallèlement à la numération totale.

Comme pour tous les groupements, l'échantillon TSC (terreau) est celui où nous observons le nombre le plus élevé d'amylolytiques : 45.000.000 de germes/g.. La dilution limite est atteinte au quatrième jour.

Pour TP (terreau), nous n'avons que 2.500.000 germes/g. et la dilution est atteinte également au quatrième jour. Cette fonction est encore importante dans Bc (boue de ruisseau), dans G (jachère) et dans Fv (fumier peu consommé). Les dilutions atteintes sont comprises entre 10^{-5} et 10^{-6} au septième jour. Le nombre des germes est beaucoup plus restreint, et les dilutions atteintes plus faibles (10^{-1} ou 10^{-2}) dans Bz N° 6, Bz N° 7 (deux terres de Brazzaville) et N (limon). Enfin, cette fonction disparaît dans S n° 1, Al, Bz N° 4, S n° 2, EA_{III} et SG_c, terres pauvres et sableuses.

Par leur répartition, leur nombre et leur activité, les amylolytiques se rapprochent donc beaucoup des dénitrifiants. Ils leur sont même, en général, nettement supérieurs en nombre.

hémicellulolyse -

C'est une fonction importante dont l'activité se révèle voisine de celle de la dénitrification. Pour TP (terreau), nous trouvons 95.000 hémicellulolytiques et la dilution limite est atteinte rapidement (dès le deuxième jour). Pour LR (terre de jardin), la même dilution n'est atteinte qu'au septième jour seulement. Pour la majorité des échantillons, nous n'arrivons qu'aux dilutions 10^{-2} à 10^{-4}. Ces germes n'ont pu être mis en évidence dans des échantillons comme S n° 3 et S n° 4, SG_c, Bz n° 4, Al et P, terres sableuses et terre de culture de Brazzaville (Bz n° 4).

7)- La cellulolyse -

En ce qui concerne ce groupement, il faut d'abord rappeler que les techniques de mise en évidence, aussi bien en aérobiose qu'en anaérobiose, sont infiniment moins sensibles et fidèles que celles utilisées pour les autres fonctions. Il ne faut donc pas s'étonner que ce groupement "apparaisse" moins répandu et moins actif.

Cette fonction n'atteignant jamais de fortes dilutions, nous avons, pour comparer les échantillons à ce point de vue, ensemencé avec des suspensions-dilutions de raison 2 et non de raison 10, comme d'habitude.

Un échantillon très riche comme un terreau (TSC) permet une cellulolyse en aérobiose et en anaérobiose, mais le cas est plutôt rare. EA n° I (Sable du Sahara prélevé au bord d'un drain de plantation) nous donne des colonies de germes cellulolytiques aux dilutions 1/32 en aérobiose et 1/64 en anaérobiose. Le fumier de cheval permet également une cellulolyse active en aérobiose et en anaérobiose. Mais la cellulolyse anaérobie est infiniment plus répandue.

Aussi, pour la cellulolyse anaérobie, nous atteignons par exemple 1/32 pour LR (terre de jardin) et 1/64 pour TP (terreau 1/256 pour le fumier de Grignon, seulement 1/16 pour les boues de ruisseau, et 1/2 pour L (terre de prairie).

S_c (Sable de la région parisienne) ne nous a pas permis d'observer une attaque de la cellulose pas plus que E (terra

rossa) S n° 3 (sable du Sahara), Bz n° 1, Bz n° 2 (échantillons de Brazzaville), IP (prélèvement de l'Antarctique), Bz n° 6 et Bz n° 7 (terre de pâturage et de berges du Niari près de Brazzaville).

Ainsi, en aérobiose, nous observons des cellulolytiques dans des échantillons comme les terreaux et les fumiers, échantillons riches en matière organique. Un fait curieux est à signaler, c'est la présence de bactéries thermophiles cellulolytiques aérobies dans un prélèvement d'El Arfiane (EA_I), sable saharien irrigué ; ces germes y sont mis en évidence jusqu'à la dilution 1/32. La présence de ces bactéries cellulolytiques est peut-être liée à la culture et à l'humidité du lieu de prélèvement.

En anaérobiose, cette fonction est plus répandue, elle concerne un plus grand nombre d'échantillons : ceux qui renferment des cellulolytiques aérobies (c'est-à-dire les terreaux et les fumiers) et, en plus, les terres de jardin, boue de ruisseau et terres de prairies. Tous les prélèvements sont, il faut le noter, riches en matières organiques.

Nous retrouvons ici également le cas un peu exceptionnel de EA_I, sable d'El Arfiane irrigué, où la cellulolyse atteint la dilution de 1/64 : dans cet échantillon pauvre en matière organique, nous avons une cellulolyse importante.

duction des sulfates -

Cette fonction est peu répandue, les germes sont peu nom-

breux et les dilutions limites atteintes sont toujours élevé

Fv	(fumier)	1/1024
Tr	(terreau)	1/512
Bo	(boue)	1/256
G	(jachère)	1/64
N	(limon)	1/32
LR	(jardin)	1/16
Bz n° 6	(terre de pâturage de Brazzaville)	1/4

A_3 (tourbe), IP (sol de l'Antarctique), Bz n° 7 (berges du Niari), E (terra rossa), S n° 1, 2 et 3 (sables du Sahara) n'en renferment pas.

C- DISCUSSION ET CONCLUSIONS -

L'étude de la répartition et de l'activité des groupeme physiologiques thermophiles s'est révélée très fructueuse, comme le montrent les points suivants :

1)- Tout d'abord, deux fonctions n'ont pu être mises en évi dence : la fixation de l'azote (en aérobiose et en anaérobios et la nitrification. Ce point mérite d'être discuté car certains auteurs ont apporté des résultats différents.

En ce qui concerne la fixation de l'azote, PRINGSHEIM seul avait observé une fixation d'azote libre de 0,2 mg. par gramme de sucre fermenté par une bactérie sporulée, à la temp rature de 61°. Nos expériences, rigoureuses, puisque nous avons tenté plusieurs passages successifs à partir des mêmes

tubes d'ensemencement, montrent l'inexistence de cette fonction. Il faut rappeler, en outre, combien la méconnaissance des bactéries oligo-nitrophiles ou même la simple dissolution dans les milieux de culture de NH_3 atmosphérique, introduisaient autrefois des causes d'erreurs dans la mise en évidence de la fixation d'azote moléculaire.

Quant à la nitrification, nous n'avons jamais pu observer la formation de nitrates, ni de nitrites à 56° ; cependant, CAMPBELL indique pour Nitrosobacillus thermophilus une faible accumulation de nitrites. A ce sujet, il faut tout d'abord remarquer que, comme nous, WAKSMAN (1939) nie la possibilité pour Nitrosomonas et Nitrobacter de cultiver à 56° ; par ailleurs, on sait depuis peu que la formation de nitrites n'est pas un test absolu de nitrification, ceux-ci pouvant provenir du métabolisme de substances aminées ; il faut penser également aux réactifs de détection qui sont d'une telle sensibilité que des témoins très stricts doivent toujours être préparés (impureté des produits et même nitrites d'origine atmosphérique)

2)- En revanche, tous les autres groupements physiologiques ont été mis en évidence.

La fonction la plus importante semble être la protéolyse. Numériquement, les protéolytiques suivent de près la richesse de la microflore totale et des dilutions voisines sont atteintes. L'amylolyse semble presque aussi répandue, mais les germes sont moins nombreux. Cette fonction est suivie par la

dénitrification. Moins de germes encore attaquent les hémicelluloses. L'hydrolyse de la cellulose à 56° en aérobiose est peu fréquente, compte tenu des restrictions techniques déjà signalées. Les cellulolytiques anaérobies et les sulfato réducteurs sont plus nombreux.

3)- La comparaison de la numération de la microflore thermophile totale d'une part et des numérations pour chaque groupement d'autre part doit faire admettre le fait que les thermophiles accomplissent plusieurs fonctions. Il s'ensuit qu'un même germe est capable d'attaquer les protéines et l'amidon, ou encore l'amidon et les hémicelluloses, etc... Le fait qu'ils puissent accomplir plusieurs fonctions permet de penser qu'ils possèdent un équipement enzymatique correspondant. Cette question sera approfondie dans un des chapitres suivants (Voir page 159).

4)- La lecture des courbes accompagnant les fiches signalétiques nous montre l'activité des groupements : la protéolyse est en général la fonction la plus active. Elle est suivie de près par l'amylolyse. Quant à la dénitrification et l'hémicellulolyse, elles atteignent des dilutions moins élevées.

5)- Quels sont les facteurs qui régissent la répartition de ces différents groupements ?

Nous avons constaté, au cours de notre analyse, un certain parallélisme entre les fonctions et le nombre de germes

de la microflore thermophile totale. Il y a donc lieu de penser que les mêmes facteurs interviennent, tels qu'ils ont été décrits au début de ce chapitre.

De fait, dans les prélèvements riches en matières organique, dont la teneur en eau est élevée et où la fumure est intervenue, non seulement la microflore totale est importante mais toutes les fonctions sont représentées. La protéolyse est la plus active, les dilutions limites sont atteintes très rapidement, et elle concerne un grand nombre de germes. Les autres fonctions : amylolyse, dénitrification, hémicellulolyse, cellulolyse et réduction des sulfates sont représentées par un nombre de germes décroissant.

Au fur et à mesure que nous voyons baisser la teneur en matière organique et en eau des échantillons, les fonctions sont moins actives et concernent un nombre de germes de plus en plus restreint. Les fonctions finissent par s'effacer, d'abord la réduction des sulfates et la cellulolyse (aérobie, puis anaérobie), ensuite la dénitrification et l'hémicellulolyse, enfin l'amylolyse, la protéolyse étant la dernière à disparaître.

Nous signalerons ici que nous n'avons pu mettre en évidence la fonction protéolytique dans un sable du Sahara S n° 3 provenant d'une daïa. Nous avons affaire dans ce cas à un échantillon sans matière organique, où la fumure n'est jamais intervenue et dont le taux d'humidité est extrêmement faible.

Chapitre III

ÉQUILIBRE THERMOPHILES/MÉSOPHILES TELLURIQUES

Le rapport entre le nombre de bactéries thermophiles d'un sol et celui des bactéries mésophiles de ce même sol a fait l'objet d'un petit nombre de travaux, bien que ces études aient pour première conséquence de montrer la complexité du problème des zones thermiques d'activité bactérienne (de leur étendue, de leurs minima et maxima, de leur optimum) par là même, de mieux comprendre les difficultés rencontrées pour définir et classer ces germes.

A- DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES -

Nous retrouvons une fois de plus l'opposition entre les deux auteurs qui se sont occupés de l'écologie des thermophile

En effet, NEGRE (1913) note, dans les sables du Sahara, une faible teneur en germes mésophiles et un nombre beaucoup plus important de thermophiles.

Les valeurs données sont les suivantes :

- Grand Erg : 7 thermophiles pour 1 non thermophile,
- El Oued : 6 - - 0 - -
- Figuig : 4 - - 1 - -

MICHOUSTINE (1950), par contre, signale que le rapport des germes thermophiles par rapport aux germes mésophiles est d'environ 1/10 à 1/100. Mais l'auteur ne précise pas pour quels sols ce rapport est valable.

On est donc frappé par la pauvreté de nos connaissances en ce domaine ; aussi est-ce là un chapitre que nous avons particulièrement étudié.

ERCHES EXPÉRIMENTALES -

Il nous a, en effet, été possible d'approfondir l'étude du rapport des groupements thermophiles et mésophiles parce que nos techniques de recherches des thermophiles, ainsi que nous l'avons dit ailleurs, sont basées sur les mêmes principes que pour les mésophiles. La comparaison est donc aisée et valable. Nous avons déjà noté les différences qui existent entre les populations thermophiles provenant d'échantillons divers. Il est intéressant de savoir si le rapport thermophiles/mésophiles est constant ou s'il varie suivant les échantillons. C'est, en quelque sorte, l'étude de l'équilibre statique des thermophiles/mésophiles dans les sols.

Mais il est un deuxième aspect du problème, plus dynamique, que nous avons envisagé ; en effet, nous avons voulu déterminer le nombre de germes dans un même échantillon suivant

la température de culture, en faisant varier cette températ
selon un gradient bien déterminé. Ceci nous a amenée à env
sager la notion d'activité d'un groupement fonctionnel.

Nous envisagerons successivement :

- l'équilibre statique thermophiles/mésophiles,
- l'équilibre dynamique thermophiles/mésophiles
- la répartition fonctionnelle du rapport thermophiles-/mésophiles,
- l'activité des groupements fonctionnels.

1)- Equilibre statique thermophiles/mésophiles -

Nos numérations comparées de thermophiles et de méso-
philes ont porté sur : un terreau, une terre de jardin, une
terre de grande culture, une jachère, un sable saharien.
Cette sélection d'échantillons a été faite en fonction des
résultats obtenus précédemment sur le nombre de thermophile
ils couvrent toute l'étendue de la gamme de richesse, depui
le plus riche en thermophiles (terreau) jusqu'au plus pauvr
(sable saharien). Rappelons que la numération des thermoph
les a été faite à 56°, celle des mésophiles à 28°.

Les résultats sont résumés dans le tableau n° 6.

TABLEAU N° 6

Echantillons	Nombre thermophiles /g.	Nombre mésophiles /g.	Rapport T/M
Terreau	16 x 10^6	220 x 10^6	1/14
Terre de jardin G	2,8 x 10^6	280 x 10^6	1/100
Terre de jardin TP_4	5 x 10^6	800 x 10^6	1/160
Jachère grande culture	2 x 10^6	220 x 10^6	1/100
Sahara irrigué cultivé	50	2,5 x 10^6	1/50.000
(Ouargla) non irrigué	35	350	1/10
I et III sans végétation			

Nous constatons que le rapport thermophiles/mésophiles est variable (de 1/10 à 1/50.000 dans nos exemples), mais il ne paraît pas lié à la richesse en thermophiles ni au type de sol puisqu'il est de 1/14 pour le terreau et 1/10 pour le sable du Sahara. Dans ces deux derniers cas, les rapports sont voisins, bien que les échantillons soient très différents par leur nature et par le nombre des micro-organismes qu'ils renferment.

Il en est de même pour les rapports obtenus pour une terre de jardin ou pour une terre de grande culture, qui sont peu différents (1/100 à 1/160).

Il est, pour chaque type de sol, un facteur qui fait varier très nettement ce rapport, c'est l'humidité. Nous avons déjà noté que ce taux d'humidité conditionnait en partie le

nombre de thermophiles ; une baisse de la teneur en eau entra
ne une diminution des thermophiles ; mais cette influence
s'exerce dans le même sens, et avec beaucoup plus d'intensité
encore, sur les mésophiles, si bien que la dessication d'un s
entraîne une augmentation du rapport thermophiles/mésophiles.
Le tableau 7 montre, pour l'échantillon de terre de jardin (T
à 17 % d'eau, que ce rapport est égal à 1/160 ; après dessica
tion à 56°, il monte à 1/3 (les mésophiles sont passés de
800 x 10^6 à 5 x 10^6). C'est ce qui explique le rapport très
élevé, 1/10, trouvé dans l'échantillon de sable saharien (O_{II}
alors qu'il devient très faible après irrigation.

TABLEAU N° 7

Variations du rapport T/M en fonction de l'humidité

Echantillons	Nombre de thermophiles /g.	Nombre de mésophiles /g.	Rapport T/
TP_4 (17 % d'humidité)	5 x 10^6	800 x 10^6	1/160
TP_4 (desséché au labo)	3 x 10^6	110 x 10^6	1/35
TP_4 (desséché à 56°)	1,3 x 10^6	5 x 10^6	1/3
Ouargla (non irrigué)	35	350	1/10
Sahara (irrigué)	50	2,5 x 10^6	1/50.000

Une explication peut être trouvée à ce phénomène, dans le fait qu'une proportion importante des thermophiles sont sporulés et résistent donc parfaitement à la dessication.

quilibre dynamique thermophiles/mésophiles -

Nous savons que sous le terme "thermophile" on définit un groupement fondé sur des notions thermiques et de ce fait très arbitrairement défini. C'est la raison de malentendus dans l'interprétation des données acquises, car il s'agit souvent de microbes observés dans des conditions thermiques très différentes.

Nous avons donc cherché à préciser comment se répartissent quantitativement l'ensemble des bactéries telluriques en fonction de leur optimum thermique d'une part, et d'autre part quelle est l'activité des divers groupements microbiens physiologiques le long d'un gradient thermique.

Deux échantillons ont été choisis : un terreau (T) et une terre de jardin (G). Les numérations ont été faites aux températures suivantes : 56°, 50°, 45°, 40°, 35°, 30°, 20° et 4°. Parallèlement, nous avons mesuré l'activité des différents groupements physiologiques à chaque température. Les courbes de numération (voir Fig. 1) ont été obtenues en portant les températures en abscisses et le nombre de germes en ordonnées.

a)- Répartition de l'ensemble des bactéries telluriques en fonction de leur optimum thermique.

Les données expérimentales peuvent se résumer ainsi : aussi bien pour le terreau que pour la terre de jardin, nous avons trouvé deux clochers quantitatifs correspondant à deux optima thermiques, l'un à 30°, l'autre à 45°. Il est évident

qu'il s'agit dans le premier cas de la flore dite "mésophil
et dans le second de la flore dite "thermophile".

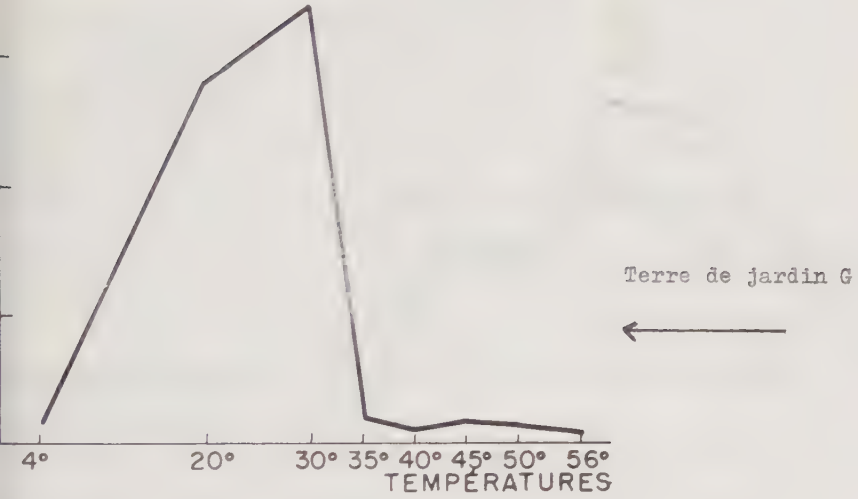
Mais la proportion relative du nombre de germes dont
les optima thermiques sont respectivement de 30° et de 45°
bien différente dans le terreau et dans la terre de jardin,
comme nous l'avait déjà appris l'étude statique de la répar
tion thermophiles/mésophiles (paragraphe précédent).

b)- Répartition fonctionnelle des thermophiles/mésophiles.

Cette répartition quantitative à deux optima thermiqu
se retrouve-t-elle qualitativement au niveau des groupement
physiologiques ? C'est ce que nous apprennent les courbes
obtenues pour la protéolyse, la dénitrification et l'amylol
échelonnées sur le même gradient thermique ci-dessus.

La figure N° 2 montre que les germes appartenant à ce
trois groupements physiologiques se répartissent, comme la
microflore totale, sur une courbe à deux sommets en fonctio
de la température. Mais, dans chaque groupement, la différ
de répartition quantitative des mésophiles (sommet à 30°) e
de thermophiles (sommet à 45°) est moins accentuée, selon q
s'agit du terreau ou de la terre, que pour la microflore to
le. Le point important à retenir est cependant la présence
d'un double optimum thermique correspondant à chacun des gr
pements physiologiques testés.

FIG. N° 1 - COURBES DE NUMÉRATION, EN FONCTION DE LA TEMPÉRATURE.



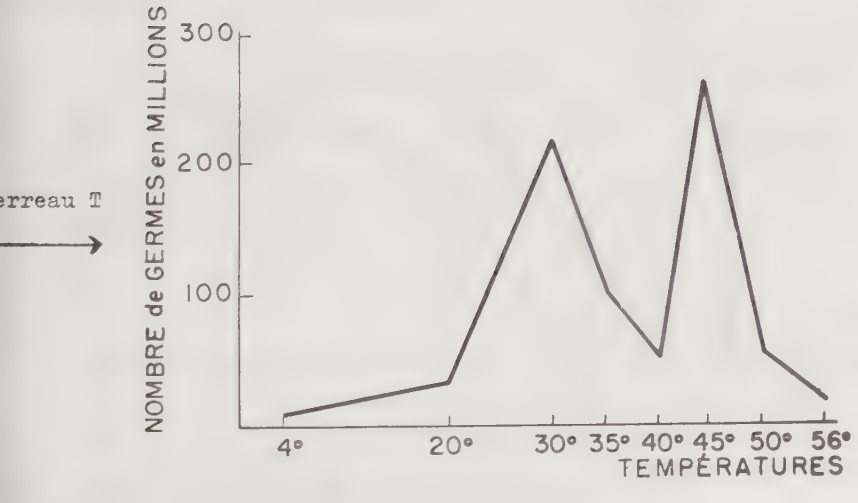
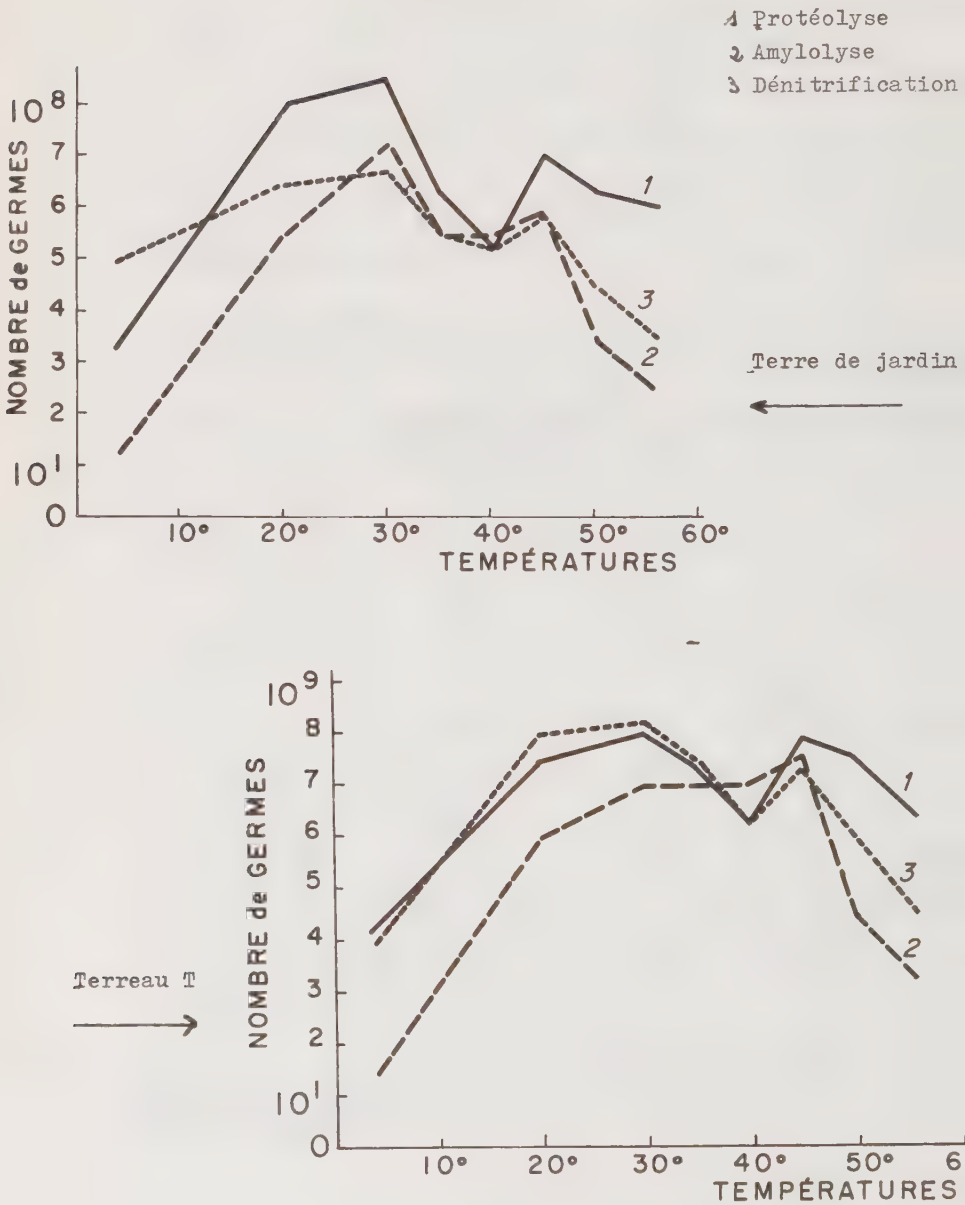


FIG. N° 2 - COURBES DE NUMERATION DES DIFFERENTS GROUPEMENTS FONCTIONNELS SUIVANT LA TEMPERATURE.



c)- Activité des groupements fonctionnels.

On peut entendre par activité d'un groupement fonctionnel la rapidité avec laquelle le substrat est métabolisé. Cette activité peut être mise en évidence en traçant une courbe (Fig. 3) qui montre la progression du métabolisme du substrat. Cette activité est liée, d'une part au nombre de germes, et d'autre part à l'activité même des germes de l'inoculum.

En règle générale, plus la pente initiale de la courbe est accentuée et plus la dilution limite finale est poussée, plus le groupement est actif.

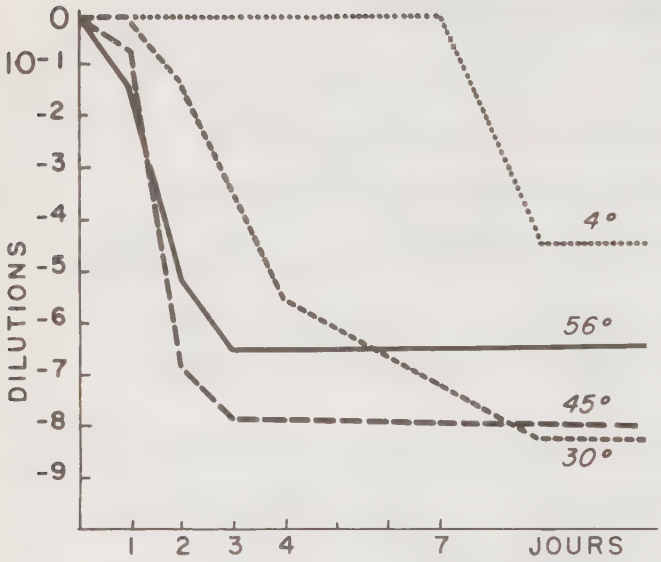
Nous avons donc tracé ces courbes pour la protéolyse et l'amylolyse dans le terreau (T) et la terre de jardin (G), à toutes les températures expérimentées dans ce chapitre.

Pour rendre la figure plus lisible, nous n'y avons représenté que les courbes correspondant à 4, 30, 45 et 56°. Les résultats sont concordants pour les deux groupements.

Considérons d'abord les dilutions limites (qui renseignent sur le nombre de germes). Pour la terre de jardin, elles sont en ordre croissant de 4 à 56, 45 et 30° (maximum). Elles sont, pour le terreau, en ordre croissant également, de 4 à 56 - 30 et 45° (maximum). Ceci n'est d'ailleurs qu'une vérification de la répartition quantitative exprimée par la figure N° 1 précédente.

Considérons maintenant l'activité, traduite par la vitesse d'attaque (latence et pente de la courbe). Nous constatons même dans la terre de jardin une bien plus grande activité à

FIG. N° 3 - ACTIVITE DES GROUPEMENTS
A DIFFERENTES TEMPERATURES.



Terreau.
Protéolyse à
4, 30, 45 et 56

←

Terreau
Amylolyse à
4, 30, 45 et 56°.

→

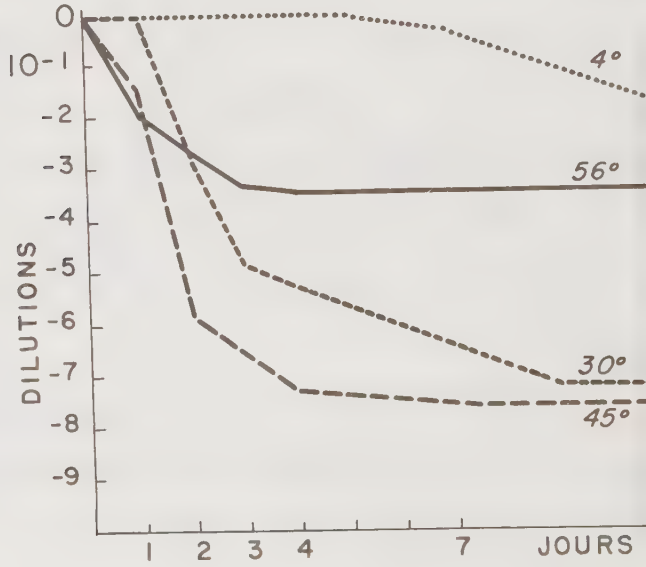
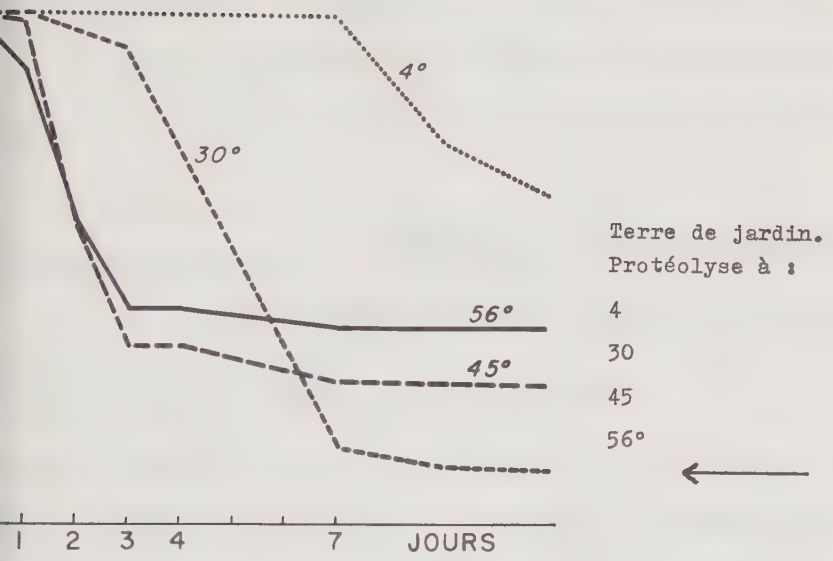


FIG. N° 4 - ACTIVITE DES GROUPEMENTS
A DIFFERENTES TEMPERATURES.



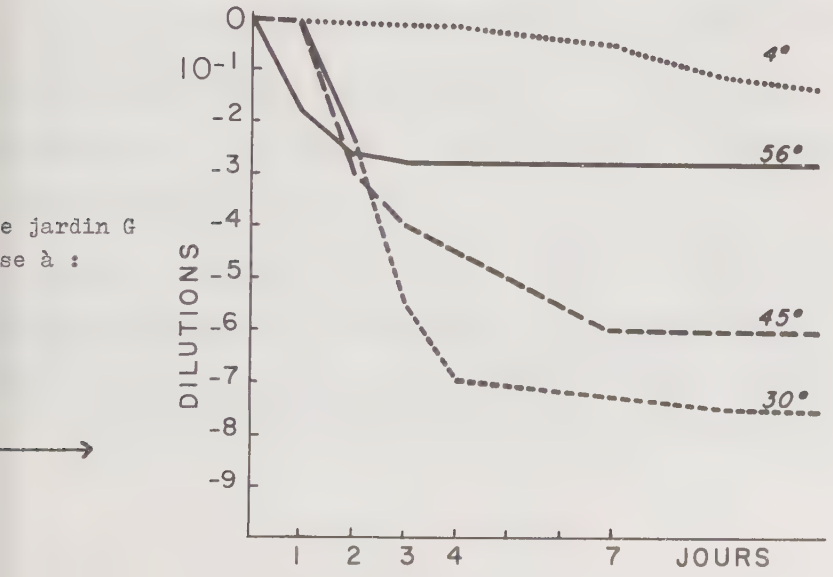
Terre de jardin.
Protéolyse à :

4

30

45

56°



e jardin G
se à :

45 et 56° qu'à 30°, ce qui signifie que les thermophiles, bien que moins nombreux que les mésophiles, y métabolisent plus rapidement le substrat. La différence d'activité est moins nette dans le terreau, sauf pour la température 4°, où l'activité est très faible (comme d'ailleurs pour la terre

C- DISCUSSION DES RÉSULTATS ET CONCLUSIONS -

Les résultats consignés dans ce chapitre appellent troi ordres de considérations et de conclusions :

1)- A notre sens, les faits observés à propos de l'équi libre dynamique, c'est-à-dire la courbe de répartition, dans un sol donné, des germes en fonction de leur optimum thermiqu nous permettent d'envisager une solution au problème de la cl sification des germes telluriques quant à leurs réactions à l température. Cette question sera reprise au chapitre III de la quatrième partie où d'autres résultats viendront l'étayer.

Disons seulement ici que la répartition de ces ger- mes suivant leur optimum thermique de croissance nous a montr deux maxima, le premier à 30°, le second à 45°. Ces observa- tions nous amènent à penser qu'il existe des mésophiles dont l'optimum de croissance est aux environs de 30°, peu ou pas d thermophiles vrais dont l'optimum est 56°, mais en revanche un assez grand nombre de thermophiles dont l'optimum se situe entre 40 et 50°. A ces derniers peuvent s'ajouter, d'une par les mésophiles dont la température limite maxima est 45° et

des thermo-tolérants cultivant de 28 à 56°, d'autre part des thermophiles dont la limite minimum est de 45°.

Ceci n'est qu'une hypothèse, mais nous verrons plus loin (IVme partie, chapitre III) d'autres arguments en sa faveur.

2)- La répartition relative thermophiles/mésophiles, mal connue jusqu'à ce jour, des principaux groupements microbiens physiologiques, est ici précisée. Elle suit de très près celle de la microflore totale, ce qui est d'ailleurs logique. Il n'y a pas de groupement qui serait l'apanage plutôt des thermophiles que des mésophiles, ou inversement.

3)- Enfin, la notion de l'"activité" des groupements (ou des souches) en fonction de la température de culture, a été bien mise en évidence, dans ce chapitre, par les courbes de protéolyse et d'amylolyse à 4, 30, 45 et 56°.

Cette activité biochimique, un des caractères essentiels des thermophiles, a été étudiée par HANSEN (1933) qui a déterminé l'activité de la fermentation des thermophiles facultatifs. Elle est 33 fois plus rapide pour Streptococcus lactis à 55° qu'à 20°.

IMCHENETSKY (1944) étudie comparativement l'hydrolyse de la cellulose par les bactéries cellulolytiques thermophiles et mésophiles. Il met en évidence la grande activité des formes thermophiles, activité également retrouvée dans d'autres groupements physiologiques.

Pour cet auteur, l'activité biochimique dans une zone déterminée de température serait régie par la loi de VAN'T HOFF. L'accélération des processus biologiques sous l'influence de l'élévation de la température continue jusqu'à un certain optimum après lequel commence l'action inhibitrice. La température optima des thermophiles étant de 30° plus élevée que celle des mésophiles, avec un $Q_{10} = 2$, la rapidité théorique du processus chez la forme thermophile doit être 8 fois plus élevée que chez la forme ordinaire. La protéolyse, la dénitrification et l'hydrolyse de l'amidon, réalisées par les thermophiles, sont 7 à 14 fois plus rapides que chez les mésophiles.

Sur ce dernier point, nous arrivons à des conclusion différentes ; si oes germes sont très actifs, ils ne le sont pas, comme le veut IMCHENETSKY, 7 ou 14 fois plus que les mésophiles. Il nous a été facile de comparer les vitesses de réaction, puisque nous avons utilisé les mêmes milieux pour les mésophiles et les thermophiles ; de plus, les germes isolés proviennent du même échantillon de sol, et nous pouvons affirmer que dans les conditions où nous avons travaillé la vitesse de réaction des thermophiles n'est que de 2 à 3 fois celle des mésophiles. Cette observation est d'ailleurs confirmée par les courbes obtenues p. 134 et 135 pour les activités des groupements protéolytiques et amylolytiques aux températures de 4, 30, 45, 56° (il s'agissait là de populations),

qui nous montrent que, pour le terreau (T), la dilution limite de $10^{-6,-5}$ est atteinte au troisième jour à 56° et au 6ème jour à 30°. La liquéfaction de la gélatine est terminée à 56° au troisième jour ; à 30°, elle ne l'est qu'au neuvième jour.

Enfin, rappelons à ce propos, l'absence de phase stationnaire à 56° pour les thermophiles, phase qui apparaît pour les mêmes germes quand la température de culture est plus basse (Fig. N° 3 et 4).

QUATRIÈME PARTIE

QUELQUES ASPECTS

DE LA MORPHOLOGIE ET DE LA BIOLOGIE

DES BACTÉRIES THERMOPHILES.

QUATRIÈME PARTIE

QUELQUES ASPECTS DE LA MORPHOLOGIE ET DE LA BIOLOGIE DES BACTÉRIES THERMOPHILES

Chez les bactéries thermophiles, la vie, à une température élevée, s'accompagne de caractères particuliers : le fait le plus saillant est que ces germes se reproduisent rapidement, c'est-à-dire que leurs cellules se divisent vite et meurent à un rythme accéléré. Il s'ensuit que les réactions biochimiques, accompagnant leur culture, sont également rapides.

Quatre points ont été envisagés, formant les quatre chapitres de cette partie .

- Etude de la morphologie des germes et de leurs activités bio-chimiques dans les milieux de culture.

- Etude de la plurivalence fonctionnelle des bactéries thermophiles.

- Etude des propriétés thermiques (optimum et tolérance thermique des souches).

- Etude de la respiration à différentes températures.

Pour mener à bien les recherches de cette quatrième partie et mieux étudier certains aspects de ces micro-organismes, nous avons été amenée à isoler des souches en culture pure.

Chapitre I

MORPHOLOGIE ET CARACTÈRES CULTURAUX.

A- DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES -

De nombreux travaux ont décrit la morphologie des therm
philes.

La majorité des germes sont, pour MICHOUSTINE (1950), d
bâtonnets formant généralement des spores, qui peuvent facile
ment résister et survivre à une élévation de température ;
ces bactéries sont donc avantagées dans les zones de tempéra-
ture élevée. Mais ce fait n'est pas l'apanage des thermophi-
les, car de nombreux mésophiles stricts sporulent également.
Des bactéries non sporulées se rencontrent également chez les
thermophiles, mais elles sont moins nombreuses (MICHOUSTINE)
toujours pour cet auteur, parmi les bactéries thermophiles, o
ne rencontre pas de formes à grandes cellules rappelant B.
megatherium.

Parmi les formes bacillaires, formant la masse prépondé
rante des thermophiles, on observe surtout des bâtonnets grê-
les ; mais MIEHE (1907) montre que la largeur des bactéries
se développant à des températures élevées peut varier sensi-
blement suivant la température du milieu environnant.

Souvent, les bâtonnets thermophiles sont mobiles, péritriches ; cependant les formes décrites par DAMON et FEIRER (1925) sont immobiles.

La rapidité de croissance amène MICHOUSTINE (1950) à admettre que des cultures sur gélose donnent en 24 heures des colonies géantes ; par contre, LOGUINOVA (1960) signale que l'adaptation des germes aux températures élevées produit un changement des caractères culturaux chez les thermophiles : un fait caractéristique est la diminution de la taille des colonies. Opinion opposée à celle de MICHOUSTINE qui observe des colonies géantes.

Enfin, il faut noter les remarques importantes de IMCHENETSKY et GAUGHRAM (1947) sur l'adaptation des micro-organismes aux températures élevées ; leurs caractères culturaux et morphologiques peuvent se modifier ; ainsi les bâtonnets soumis à des températures élevées s'allongent et s'amincissent, prennent parfois une forme recourbée ; leur protoplasme contient un plus grand nombre de granules.

Des thermophiles coccoïdes ont été rencontrés dans l'eau et les substances alimentaires ; en voici quelques exemples : un Micrococcus isolé par Van TIEGHEM en 1881, un Coccus isolé par TIRELLI (1907), le Staphylococcus de NEGRE (1913). NEGRE isole également de l'eau, en culture pure, un Vibrion, et ELION (1924) obtient Vibrio thermodesulfuricans à partir de la boue de caniveau. Des formes filamenteuses thermophiles ont

été trouvées par MIYOSHI (1897) dans l'eau.

B- RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX -

I- En vue de leur étude morphologique, nous avons isolé 100 souches à 56° (nous les avons colorées par des réactifs simples tels que le bleu de méthylène ou la fuchsine).

Toutes ces colorations permettent de mettre en évidence des bâtonnets et des formes filamenteuses, ces dernières surtout nombreuses dans les cultures âgées. Des formes coccoïde n'ont pu être observées.

II- Caractères culturaux de quelques souches -

1)- Parmi les souches bactériennes isolées à 56°, nous en avons sélectionné 5, comme indiqué dans le tableau N° 8 ci-dessous.

TABLEAU N° 8

Désignation	Origine	Milieu d'isolement
ET_{IV}	terreau	isolée sur extrait de terr
AT-10	terreau	- amidon
DNO_2-P-1	puits de pétrole	- glucose-nitrate
PP -3	puits de pétrole	- gélatine
AB_6-1	terre de pâturage	- amidon

Nous avons étudié les diverses caractéristiques de ces souches ; c'est ainsi que nous avons observé leur morphologie à l'état frais et après coloration par la méthode de Gram et

que nous avons précisé leurs caractères culturaux sur les milieux classiques de la bactériologie médicale (bouillon, gélose, lait, pomme de terre, sérum, etc...).

Ces caractères sont résumés dans les tableaux N°^{s} 9, 10, 11, 12 et 13.

TABLEAU N° 9

SOUCHE AT - 10

Etat frais - Germes courts, mobiles sur place, présentant des mouvements d'oscillation et de pirouette.

Gram standard - Bâtonnets courts de 2,5 à 3,5 µ de long sur 0,5 de large environ, Gram négatif, quelques formes plus longues isolées, quelques éléments sont disposés parallèlement ou en chaînettes. Spores subterminales déformantes clostridiennes

Géloce nutritive - Petites colonies rondes légèrement bleutées.

Bouillon nutritif - Trouble épais, homogène, donnant des ondes moirées.

Lait tournesolé - Décoloré après culture.

Petit lait tournesolé - Vire au bleu.

Amidon - Non attaqué.

Eau peptonée au rouge de phénol - Non décolorée.

Gélatine nutritive - Liquéfaction.

Sérum coagulé - Colonies moyennes sphériques d'aspect jaunâtre.

Gélose au rouge neutre - Cultive, mais le milieu est inchangé.

Pomme de terre - Pas de culture.

Urée-indole - Absence d'indole.

Milieu au citrate (Simmons) - Pas d'utilisation du citrate.

Clark-Lubs - Le test au rouge de méthyle est négatif. Pas d'acétylméthyl-carbinol.

Gélose Veillon - Pas de gaz en profondeur.

Sucres :		
	Lévulose	+
	Maltose	+
	Mannite	+
	Xylose	+
	Saccharose	+
	Arabinose	+
	Glucose	+
	Lactose	-
	Galactose	-

TABLEAU N° 10

SOUCHE ET_{IV}

Etat frais - Bâtonnets isolés, parfois en chaînettes de 2 éléments. Les germes isolés sont animés d'un mouvement de pirouette et d'oscillation sur place, très rapide.

Gram standard - Bâtonnets longs, épais bouts carrés, 3 µ de long sur 0,5 à 1 µ de large. Gram négatif. Isolés ou disposés parallèlement par 2, 3 ou 4 éléments. Les formes les plus longues semblent formées de deux bâtonnets mis bout à bout. Quelques longs filaments. Pas de spores.

Gélose nutritive - Colonies moyennes arrondies légèrement bleutées.

Bouillon nutritif - Trouble non homogène, présence de flocons et de filaments qui tombent au fond du tube. Voile en surface.

Lait tournesolé - Décoloré.

Petit lait tournesolé - Vire au rose.

Amidon - Pas d'attaque.

Eau peptonée au rouge de phénol - Non décolorée.

Gélatine nutritive - Légèrement liquéfiée.

Sérum coagulé - Cultive en donnant de petites colonies.

Gélose au rouge neutre - Cultive sans décoloration.

Pomme de terre - Pas de culture.

Urée-indole - Pas d'indole.

Milieu au citrate (Simmons) - Pas de culture. Pas de virage au bleu. Le milieu n'est pas modifié.

Milieu de Clark-Lubs - Le test au rouge de méthyle est négatif (pH 6), le milieu est jaune. Pas d'acétylméthylcarbinol.

Gélose Veillon - Pas de gaz en profondeur.

Sucres - Cette souche attaque tous les sucres utilisés (Lévulose, Maltose, Mannite, Saccharose, Glucose, Xylose, Galactose, Arabinose, Lactose).

TABLEAU N° 11

SOUCHE DN_2 P-1

Etat frais - Bâtonnets mobiles présentant des mouvements d'osc
lation très vifs et des pirouettes sur place.

Gram standard - Bâtonnets de 2,5 µ de long sur 0,5 à 1 µ envir
Gram négatif, isolés ou disposés parallèlement : quelques
longs filaments granuleux.

Gélose nutritive - Colonies rondes, opaques, bleutées.

Bouillon nutritif - Trouble homogène, ondes moirees.

Lait tournesolé - Décoloré après culture, non coagulé.

Petit lait tournesolé - Non modifié.

Amidon - Non attaqué.

Eau peptonée au rouge de phénol - Pas de décoloration du milie

Gélatine nutritive - Liquéfaction.

Sérum coagulé - Colonies moyennes, sphériques, d'aspect jaunât

Gélose au rouge neutre - Présence de colonies, mais le milieu
n'est pas modifié.

Pomme de terre - Pas de culture.

Urée-indole - Absence d'indole.

Milieu au citrate (Simmons) - Pas de modification du milieu.

Clark-Lubs - Test au rouge de méthyle négatif. Pas d'acétyl-
méthylcarbinol.

Gélose Veillon - Pas de gaz en profondeur.

Sucres - Fermentations parfois irrégulières :

Lévulose	+	Xylose	ε (1)
Maltose	+	Galactose	-
Mannite	+	Arabinose	-
Saccharose	+	Lactose	-
Glucose	+		

(1)- ε réaction intermédiaire entre + et -

TABLEAU N° 12

SOUCHE AB_6-1

tat frais - Petits bâtonnets courts, mobiles. Mouvements d'oscillation et de pirouette sur place.

ram standard - Bâtonnets de 2,5 µ de long sur 0,5 de large, Gram négatif, isolés, quelquefois en chaînettes de 2, 3 ou 4 éléments. En culture âgée, bâtonnets courts et très nombreux.

élose nutritive - Colonies moyennes, blanches, opalescentes.

ouillon nutritif - Trouble homogène du milieu, ondes moirées et dépôt au fond du tube.

ait tournesolé - Décoloré après culture.

etit lait tournesolé - Légèrement plus foncé après culture.

midon - Non attaqué.

au peptonée au rouge de phénol - Non décoloré.

élatine nutritive - Liquéfaction.

érum coagulé - Petites colonies sphériques d'aspect jaunâtre.

élose au rouge neutre - Cultive, mais le milieu n'est pas modifié.

omme de terre - Le germe cultive en donnant un enduit blanchâtre.

rée-indole - Absence d'indole.

ilieu au citrate (Simmons) - Pas de modification du milieu.

lark-Lubs - Test négatif avec le rouge de méthyle. Absence d'acétylméthylcarbinol.

élose Veillon - Pas de gaz en profondeur.

ucres - Non attaqués (Lévulose, Maltose, Mannite, Saccharose, Glucose, Xylose, Galactose, Arabinose, Lactose).

TABLEAU N° 13

SOUCHE PP-3

Etat frais - Bâtonnets plus mobiles et formes filamenteuses.

Gram standard - Gram négatif. Longs filaments et quelques gros bâtonnets aux extrémités arrondies de 4 µ de long sur 1 µ de large environ. Quelques chaînettes composées d'un grand nombre d'éléments.

Gélose nutritive - Colonies d'aspect granuleux qui, au cours du vieillissement, s'étalent et acquièrent un bord dentelé.

Bouillon nutritif - Trouble, ondes moirées, dépôt important au fond du tube.

Lait tournesolé - Décoloré après culture.

Petit lait tournesolé - Bleuissement du milieu.

Amidon - Attaqué.

Eau peptonée au rouge de phénol - Non décolorée.

Gélatine nutritive - Non liquéfiée.

Sérum coagulé - Colonies rondes blanchâtres d'aspect desséché.

Gélose au rouge neutre - Culture, mais le milieu n'est pas décoloré.

Pomme de terre - Enduit épais, brunâtre.

Urée-indole - Pas d'indole.

Milieu au citrate (Simmons) - Milieu inchangé, pas de virage au bleu.

Clark-Lubs - Le rouge de méthyle vire au jaune, donc le test est négatif. Pas d'acétylméthylcarbinol.

Gélose Veillon - Pas de gaz en profondeur.

Sucres -				
	Lévulose	+	Xylose	+
	Maltose	+	Mannite	+
	Saccharose	+	Galactose	-
	Arabinose	+	Lactose	-
	Glucose	+		

2)- Les données que nous pouvons tirer de ces isolements sont les suivantes :

a)- Au point de vue de la morphologie, nous trouvons des bâtonnets et des formes filamenteuses.

b)- La culture sur pomme de terre permet de constater quelques différences : ainsi les souches PP-3 et AB_6-1 cultivent sur pomme de terre, la première en donnant un enduit épais et brunâtre, la seconde des colonies blanchâtres ; les trois autres souches ne cultivent pas sur ce milieu. Les auteurs qui, comme RABINOWITCH, utilisent le milieu pomme de terre pour l'isolement des thermophiles, sélectionnent donc les germes ; en fait, ce milieu permet de différencier des souches entre elles.

c)- En ce qui concerne la fermentation des sucres, toutes les possibilités sont rencontrées : AB_6-1 n'attaque aucun des sucres suivants : lévulose, maltose, mannite, xylose, galactose, saccharose, arabinose et lactose, alors que ET_{IV} les fait fermenter tous. Les autres souches font fermenter un certain nombre de sucres seulement.

La fermentation des sucres jugée par virage d'un indicateur de pH, est souvent douteuse, comme cela est fréquent pour tous les germes d'origine tellurique ; c'est d'ailleurs une des causes de la difficulté de leur identification.

d)- En ce qui concerne la stabilité des caractères, nous constatons que la souche AB_6-1 isolée sur milieu amidon,

puis conservée sur extrait de terre, n'attaque plus alors l'amidon, mais cultive sur pomme de terre. La souche AT-1C isolée également sur milieu amidon puis conservée sur extra de terre, ne cultive plus ni sur amidon ni sur pomme de ter On peut donc constater une certaine variabilité des caractè qui s'expliquerait par l'hypothèse suivante : cette souche AB_6-1 aurait perdu le pouvoir de synthétiser un facteur de croissance qu'elle retrouverait sur le milieu complexe qu'e la pomme de terre. Une observation analogue a été signalée par MICHOUSTINE en 1950.

e)- A la limite inférieure de température (28°), nous avons voulu voir comment se comportaient les souches isolée Nous avons constaté que ET_{IV} cultive encore à 28°, à condit d'ensemencer avec un volume important. Cependant, les pass ges suivants sont nettement plus difficiles. Il en est de même de AT-10 et DNO_2 P-1 et PP-3. En revanche, AB_6-1 ne cultive pas à 28°. Par conséquent, à cette température les souches peuvent avoir des comportements différents.

Ces mêmes souches cultivées à 73° fournissent les résultats suivants :seules PP-3, DNO_2 P-1 et ET_{IV} donnent un début de culture au premier passage, à condition que l'e semencement soit massif ; les autres souches ne cultivent p

f)- Enfin, il nous faut, en terminant ce paragraphe consacré aux souches pures, signaler les difficultés que no rencontrons comme presque tous ceux qui ont travaillé sur c

type de germes, pour leur assigner une place dans la Systématique, les rattacher à une espèce éventuellement déjà existante, ou les décrire comme espèces nouvelles.

La détermination des espèces telluriques à Gram - est toujours difficile ; celle des thermophiles qui présentent ce même caractère l'est encore davantage, en raison du peu de netteté des réactions biochimiques culturales classiques et de l'absence de toute clé de détermination valable, établie sur une classification admise, sinon par tous du moins par la majorité des auteurs.

Nous devons signaler, en plus de l'article de BERGEY (1919) montrant les difficultés rencontrées dans la classification des bactéries thermophiles, une publication récente de BRISBANE et ROVIRA (1961) qui confirme ce point de vue. Ces auteurs ont montré que 318 souches telluriques formaient un gradient continu vis-à-vis de 16 caractères et que la subdivision, même au niveau du genre, est absolument illusoire, remettant ainsi en question la validité de toute systématique des germes non pathogènes.

La classification de nos germes étant donc a priori, et par principe, aléatoire, nous avons cependant utilisé les clés de détermination existant à ce jour, à savoir celles de PREVOT (1961), de BERGEY (1957) et de BUTTIAUX (1961). Les résultats obtenus qui ne peuvent avoir que valeur de proposition sont les suivants :

SOUCHE AT - 10 -

Classe : Eubactériales sporulées.

Ordre : Bacillales.

Famille: Bacillaceae.

Genre : Bacillus.

Les caractères de AT-10 sont très voisins de ceux
Bacillus Stearothermophilus (DONK 1920). Notre souche e
possède les caractères essentiels mais elle est à Gram n
tif et non à Gram variable et n'attaque pas l'amidon.

Nous proposons pour cette souche B. Stearothermoph
pastorianus.

SOUCHE ET_{IV} -

Classe : Enbactériales asporulées.

Ordre : Bactériales.

Famille : Pseudomonadaceae.

Tribu : Achromobacteraceae.

Genre : Achromobacter.

Les caractères de cette souche sont voisins de ceu
décrits dans le Manuel de BERGEY pour Achromobacter deli
tulus (JORDAN, 1890), BERGEY 1923. Cependant ET_{IV} en di
par certains caractères, comme la culture sur pomme de t
la fermentation des sucres et la température de culture
est de 28 à 37° pour A. delicatulus et de 56° pour notre
che. ET_{IV} pourrait être considérée comme une variante d

cette espèce ; nous proposons le nom de A. delicatulus var. pastorianus (et non thermophilus car ce n'est pas un thermophile obligatoire).

SOUCHE DNO_2 P-1 -

Classe : Eubacteriales asporulées.
Ordre : Bacteriales.
Famille : Pseudomonadaceae.
Tribu : Achromobacteraceae.
Genre : Achromobacter.

Les caractères de DNO_2 P-1 sont voisins de ceux décrits par BERGEY pour Achromobacter iophagus (GRAY et THORNTON) BERGEY 1930. Mais la température de culture est de 30 à 35° pour A. iophagus et de 56° pour notre souche, qui pourrait être considérée comme une variété thermophile de cette espèce bien qu'elle n'attaque pas l'amidon. Nous proposons : Achromobacter iophagus var. thermophilus.

SOUCHE AB_6 - 1 -

Classe : Eubacteriales asporulées.
Ordre : Bacteriales.
Famille : Pseudomonadaceae.
Tribu : Achromobacteraceae.
Genre : Achromobacter.

La souche AB_6-1 se rapproche de l'espèce Achromobacter xerosis (GROUPE, PUGH, LEVINE et HERMAN, 1954) comme chez

les espèces précédentes, de nombreux caractères sont communs et d'autres différents : la température de culture (A. xeros cultive entre 28 et 37° et AB_6-1 à 56°), la fermentation des sucres (le glucose, le galactose et le maltose sont acidifié par A. xerosis alors que AB_6-1 ne modifie pas le pH du milie enfin l'hydrolyse de l'amidon (ce dernier étant attaqué par A. xerosis et non par notre souche). Nous nous proposons de considérer AB_6-1 comme une variété thermophile de A. xerosis Achromobacter xerosis var. thermophilus.

SOUCHE PP-3 -

Classe : Eubactériales asporulées.

Ordre : Bactériales.

Famille : Pseudomonadaceae.

Tribu : Achromobacteraceae.

Genre : Achromobacter.

La souche PP-3 est voisine d'Achromobacter guttatus (ZIMMERMAN, 1890) BERGEY 1923. Ces deux souches diffèrent comme les précédentes par la température de culture. La pre mière ayant son optimum aux environs de 25°, la seconde à 56 PP-3 pourrait être considérée comme une variété thermophile d'A. guttatus. Nous proposons : Achromobacter guttatus var; thermophilus.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS -

)- La morphologie.

Bien que des auteurs aient signalé des germes de morphologie variée, des cocci, des bacilles et des vibrions, nous n'avons rencontré pour notre part ni cocci ni vibrions ; nos techniques ne nous ont permis d'isoler que des formes bacillaires. Celles-ci sont représentées par des bâtonnets de taille très variable, isolés ou qui se groupent suivant des modes très divers : par deux, ou en courtes chaînettes ; il faut noter la tendance, surtout dans les cultures vieilles, à donner de longs filaments à contenu plus ou moins granuleux. Les espèces sporulées telluriques ne nous semblent pas plus fréquentes que chez les mésophiles.

Le fait de ne rencontrer que des formes en bâtonnet n'a rien de paradoxal car nous remarquons que les thermophiles coccoïdes ont été isolés par divers auteurs (TIRELLI (1907), RUSSELLet HASTINGS (1902)) à partir de l'eau ou de substances alimentaires. Il en est de même pour les vibrions trouvés, eux aussi, dans les eaux (NEGRE et ELION), par exemple Vibrio thermodesulfuricans.

Signalons une exception : KILLIAN et FEHRER (1939) ont mis en évidence dans les sols désertiques, en plus des germes bacillaires, des microcoques et des streptocoques. Mais leurs germes ne sont pas essentiellement des bactéries thermophiles puisque les échantillons seuls sont soumis à des températures

comprises entre 40 et 60° et les isolements faits à des températures inférieures.

Nous conclurons donc que les formes bacillaires constituent la masse prépondérante des thermophiles du sol.

2)- Caractères culturaux.

En ce qui concerne la taille des colonies, et en particulier la formation en 24 h. de colonies géantes (MICHOUSTIN le phénomène n'a pu être confirmé : sur gélose extrait de terre, les colonies obtenues sont petites, ressemblent à celles des mésophiles et peuvent être d'apparition assez tardive (3 ou 4 jours). Nos observations rejoignent plutôt celles de LOGUINOVA, pour qui l'adaptation aux températures élevées produit une diminution de la taille des colonies.

C h a p i t r e II

PLURIVALENCE FONCTIONNELLE

Nous entendons par "plurivalence fonctionnelle" la possibilité, pour une souche, d'exercer plusieurs fonctions. Par exemple, une souche amylolytique peut également être protéolytique.

Nous avons déjà signalé cette propriété dans la troisième partie (Chapitre I, p. 122), mais ici les expériences ont été faites dans le but d'approfondir la question.

ONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES -

Aucune étude n'a été réalisée, à notre connaissance, sur ce sujet. Aussi nous a-t-il semblé intéressant de regarder si, comme pour les mésophiles (CHALVIGNAC, 1957), la très grande majorité des espèces telluriques est capable d'exercer plusieurs activités.

NNÉES EXPÉRIMENTALES -

de de la plurivalence fonctionnelle des souches -

A partir de milieux électifs pour chacun des groupements

fonctionnels, nous avons isolé des souches, par deux passages successifs sur le milieu gélosé, en prélevant à chaque fois une seule colonie ; les souches pures étaient ensuite conservées sur extrait de terre. Les isolements ont été faits à 56° et à 63°. Une série d'essais nous avait permis d'obtenir des souches cultivant à 75° sur gélose extrait de terre, mais après quelques repiquages les germes ne se multipliaient plus et nous avons perdu les souches.

A 56°, nous avons conservé :

- 4 souches obtenues à partir du milieu extrait de terre,
- 24 " " " " amidon,
- 20 " " " " gélatine,
- 27 " " " " nitrate - glucose.

A 63°, nous avons étudié :

- 6 souches obtenues à partir du milieu extrait de terre,
- 9 " " " " amidon,
- 3 " " " " gélatine,
- 11 " " " " nitrate - glucose.

Ces souches qui, au départ, ont été obtenues à partir de milieux électifs, ont été ensuite ensemencées en milieux électifs différents pour examiner leur plurivalence.

En fait, nous nous sommes limitée aux groupements essentiels : les protéolytiques (isolés sur milieu à la gélatine), les dénitrifiants (milieu nitrate-glucose), les amylolytiques (milieu à l'amidon). De plus, quelques souches ont été iso-

lées directement, à partir de suspensions-dilutions, sur gélose extrait de terre. Ensuite, les souches isolées sur milieu extrait de terre, gélatine, amidon, glucose-nitrate sont réensemencées chacune dans les trois autres milieux ainsi que dans les milieux pour cellulolyse aérobie et anaérobie. L'expérience a été faite sur les souches aussitôt après leur isolement et sur les mêmes souches conservées près d'un an au laboratoire, pour juger de la stabilité des caractères fonctionnels.

Les résultats sont groupés dans divers tableaux ; les premiers sont consacrés aux souches isolées à 56°, les quatre derniers aux souches isolées à 63°. Dans chacun d'eux, nous avons noté par + les milieux sur lesquels les souches cultivent et par - ceux sur lesquels nous n'avons pas de multiplication de ces germes.

Des résultats obtenus, résumés dans les tableaux N° 14 à 21, nous pouvons faire certaines remarques :

1)- Toutes les souches, quelle que soit leur origine, cultivent sur extrait de terre. Ce milieu apparaît donc comme le plus favorable et non sélectif. Il faut dire que cette propriété a également été constatée pour les mésophiles par CHALVIGNAC (1957).

2)- Quelques rares souches sont à la fois amylolytiques, protéolytiques et légèrement dénitrifiantes ; il est plus fréquent de rencontrer des souches qui soient seulement protéolytiques et amylolytiques. Les souches réduisant en plus les

nitrates sont rares.

3)- Pas une souche ensemencée sur milieu pour cellulolytiques n'attaque la cellulose en aérobiose, mais trois souches sont cellulolytiques en anaérobiose : AT-10, DNO_2 T-3, DNO_2 T-4. La première souche, au départ, cultivait sur amidon les deux autres sur milieu glucose-nitrate. Ces souches pures qui étaient cellulolytiques en anaérobiose au premier passage, ne le sont plus après repiquage sur le même milieu. Ceci est un phénomène fréquent dans ce groupe de micro-organismes.

4)- Les mêmes résultats sont obtenus avec les souches isolées à 60-65°.

TABLEAU N° 14

SOUCHES ISOLÉES SUR MILIEU NITRATE-GLUCOSE

A 56°

Souches	Protéolyse	Amylolyse	Cellulolyse	Extrait de terre
NO_3 L-1	+	-	-	+
NO_3 L-2	+	-	-	+
NO_3 L-3	+	-	-	+
NO_3 T-2	-	-	-	+
NO_3 T-3	-	-	-	+
NO_3 T-4	+	-	-	+
NO_3 T-5	+	-	-	+
NO_3 T-6	+	-	-	+
NO_3 T-7	+	-	-	+
NO_3 T-8	+	-	-	+
NO_3 B_6-1	+	-	-	+
NO_3 B_6-2	+	-	-	+
NO_3 N-1	+	-	-	+
NO_2 T-1	+	-	-	+
NO_2 T-2	+	-	-	+
NO_2 T-3	-	-	+	+
NO_2 T-4	+	-	+	+
NO_2 T-5	+	-	-	+
NO_2 T-6	+	-	-	+
NO_2 P-1	+	+	-	+
NO_2 P-2	+	-	-	+
NO_2 B_6-1	+	+	-	+
NO_2 B_6-2	+	-	-	+
NO_2 B_6-3	+	-	-	+
NO_2 B_6-4	+	-	-	-
NO_2 T-7	+	-	-	+
NO_2 L-4	+	-	-	+

TABLEAU N° 15

SOUCHES ISOLÉES SUR MILIEU GÉLATINE

A 56°

Souches	Amylolyse	Dénitrification	Cellulolyse	Extrait de terre
P -2	-	-	-	+
P -3	+	+	-	+
P -6	+	-	-	+
P -4	+	ε	-	+
P -2 bis	-	-	-	+
T	+	-	-	+
T -7	-	-	-	+
T -7 bis	-	-	-	+
T -9	+	-	-	+
CC -8	-	-	-	+
CC -9	-	+	-	+
G -9	-	-	-	+
G -9 bis	-	-	-	+
LA -3	-	-	-	+
LB -3	-	-	-	+
LC -3	-	-	-	+
LD -3	-	-	-	+
P -7	+	+	-	+
P -8	-	-	-	+
CC -10	-	+	-	+

SOUCHES ISOLÉES SUR EXTRAIT DE TERRE

A 56°

Souches	Protéolyse	Amylolyse	Dénitrification	Cellulolyse
I 56	-	-	-	-
II 56	-	-	-	-
III 56	-	-	-	-
IV 56	ε	-	-	-

TABLEAU N° 16

SOUCHES ISOLEES SUR MILIEU AMIDON

A 56°

Souches	Protéolyse	Dénitrification	Cellulolyse	Extrait de terre
B_6 -1	+	-	-	+
B_6 -1 bis	+	-	-	+
P -2	+	-	-	+
P -2 bis	+	-	-	+
P -3	+	-	-	+
P -4	+	-	-	+
T -2	+	-	-	+
T -3	+	-	-	+
T -4	+	-	-	+
T -5	-	-	-	+
T -6	+	-	-	+
T -7	+	-	-	+
T -8	+	-	-	+
T -9	-	-	-	+
T -10	+	-	+	+
T -11	+	-	-	+
T -12	+	-	-	+
T -13	+	-	-	+
T -14	+	-	-	+
T -15	+	-	-	+
G -5	+	-	-	+
G -6	+	-	-	+
G -7	-	-	-	+
L	+	-	-	+

TABLEAU N° 17

SOUCHES ISOLÉES A 56°

Polyvalence fonctionnelle après un an de conservation

Souches	Amylolyse		Protéolyse		Dénitrification		Cellulolyse		Extrait terre	
DNO_2 P-1	+	+	+	-	-		-	-	+	+
AP -2	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
AT -9	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
PP -3	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
PP -4	+	+	-	-		+	-	-	+	+
PP -2 bis	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+
NO_3 T-8	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+
NO_3 T-6	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+
AP 2 bis	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
AP -4	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
AT -2	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
AT -10	-	-	+	+	-	-	+	ana.	+	+
AT -12	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+
AT -13	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
ET III	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
ET IV	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
NO_2 T-1	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
NO_3 L-1	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
AB_6 -1	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
PP -2	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+

1er signe : à l'isolement,

2me signe : 1 an après.

TABLEAU N° 18

SOUCHES ISOLÉES MILIEU NITRATE-GLUCOSE

A 63°

Souches	Protéolyse	Amylolyse	Cellulolyse	Extrait de terre
TSC -4	-	-	-	+
TP -3	+	+	-	+
TP -5	+	+	-	+
TSC -5	-	-	-	+
TP -3	-	Ɛ	-	+
TSC -3	+	-	-	+
TSC -4	-	-	-	+
TP -5	+	-	-	+
TP -3	-	-	-	+
TSC -4	+	-	-	+
TP -4	+	-	-	+

TABLEAU N° 19

SOUCHES ISOLÉES MILIEU GÉLATINE

A 63°

Souches	Amylolyse	Dénitrification	Cellulolyse	Extrait de terre
TP -7	-	Ɛ	-	+
TP -7	-	+	-	+
TP -7	-	+	-	+

TABLEAU N° 20

SOUCHES ISOLÉES SUR MILIEU AMIDON

A 63°

Souches	Protéolyse	Dénitrification	Cellulolyse	Extrait de terre
TP -5	-	-	-	+
TSC -5	-	-	-	+
TSC -5bis	-	-	-	+
TP -5bis	-	-	-	+
TSC -4	+	-	-	+
TP -4	-	-	-	+
TP -4bis	+	-	-	+
TP -5bis	-	-	-	+
TSC -5	+	-	-	+

TABLEAU N° 21

SOUCHES ISOLÉES SUR EXTRAIT DE TERRE

A 63°

Souches	Protéolyse	Amylolyse	Dénitrification	Cellulolyse	Extrait de terre
TSC -7 bis	+	-	-	-	+
TP -6A	-	+	-	-	+
TP -6A	-	-	-	-	+
TP -6bis		-	-	-	+
TSC -7bis	-	-	-	-	+
TSC -7	+	-	-	-	+

5)- Les thermophiles, comme les mésophiles, sont fonctionnellement plurivalents ; leur équipement enzymatique leur permet d'accomplir plusieurs activités, la plus répandue étant la protéolyse, puis l'amylolyse, très fréquemment couplées. Ceci confirme nos conclusions concernant la répartition des différentes fonctions chez les thermophiles.

6)- Du tableau N° 17, il ressort enfin que, du point de vue étudié ici, la stabilité des caractères des souches est assez satisfaisante. On note cependant quelques pertes de fonction en ce qui concerne la protéolyse.

7)- On remarquera qu'en général la plurivalence se limite à deux fonctions : protéolytique et amylolytique, ou protéolytique et dénitrificatrice. On peut supposer que certaines fonctions s'excluent.

LUSION -

En ce qui concerne la plurivalence fonctionnelle des thermophiles, où manque toute donnée bibliographique, nous avons pratiquement pu établir que, comme dans le cas des mésophiles, chaque germe peut exercer au moins deux fonctions, par exemple être à la fois protéolytique et amylolytique...
Nous confirmons donc ici les conclusions obtenues dans la troisième partie (Chapitre I, p. 122), où le nombre de germes responsables de chaque fonction, par rapport à la microflore totale, nous suggérait cette plurivalence.

Un autre fait est confirmé : dans la répartition des fonctions, nous avions remarqué que la protéolyse est la p importante et la plus répandue dans les sols. Ici encore, cette fonction est la plus fréquente dans les souches isol en culture pure.

Chapitre III

DOMAINE THERMIQUE DES BACTÉRIES THERMOPHILES

La vitalité des bactéries thermophiles dépend essentiellement du milieu environnant : à part la constitution chimique de ce dernier (il s'agit d'ailleurs ici tout particulièrement de la matière organique), la température joue également un rôle. Aussi avons-nous recherché les limites de température compatibles avec la vie des bactéries et leur multiplication.

SULTATS EXPÉRIMENTAUX -

A partir du terreau (T), nous avons isolé des souches aux températures de 56, 45 et 30°(*), que les expériences précédentes nous ont montrées les plus intéressantes. Nous avons utilisé la technique décrite précédemment (Voir chapitre "Technique", p. 29).

Ont été isolées :

- 80 souches à 56°,
- 78 " à 45°,
- 94 " à 28° (*)

(*)- Nous devons signaler que nous considérons comme équivalentes les températures de 28 et 30°. Les variations saisonnières de la pièce étuve étant à l'origine de cet écart de température entre les deux expériences.

Les souches isolées à 56° ont été réensemencées sur milieu extrait de terre et placées, une série à 45° et l'autre à 28°. Nous avons noté le pourcentage de tubes positifs c'est-à-dire ceux où nous observons le développement d'une culture.

Nous avons opéré de la même façon pour les souches isolées à 45° et à 28° qui sont réensemencées sur extrait de terre aux deux températures différentes de l'isolement. En d'autres termes, nous avons cherché les limites thermiques des souches préalablement classées en fonction de leur optim thermique.

Les résultats sont donnés dans le tableau N° 22.

TABLEAU N° 22

Température d'isolement	Nombre de souches isolées	Pourcentage de cultures positives à		
		56°	45°	28°
56°	80	100	100	9 ±
45°	78	100	100	92 ±
28°	94	13 ± 7	28 ± 9	100

Après le pourcentage observé, nous indiquons l'interva le de confiance au seuil de probabilité 5 %.

Caractères thermiques de souches isolées -

Ce tableau nous permet de tirer les conclusions suivan

tes, qui montrent la très grande complexité du problème.

1)- Parmi les souches isolées à 56° et réensemencées à 45°, nous avons 100 % de souches cultivant à 45°. Les thermophiles classiques cultivent donc en général à 45° aussi bien qu'à 56°. L'examen des courbes de numération de la page 131 montre, en plus, que les bactéries thermophiles qui cultivent à 45° ont leur température minimale aux environs de 40° et que la majorité ne se multiplie plus à 30°.

Par contre, ces mêmes souches réensemencées à 28° ne donnent que 9 % de cultures positives, donc 9 % de germes thermophiles classiques sont en réalité thermo-tolérants, cultivant à 28°, 45° et 56°.

2)- Parmi les souches isolées à 45°, toutes cultivent à 56°, ce qui montre comme précédemment que les thermophiles acceptent des températures de 45° à 56°.

Ces mêmes souches ensemencées à 28° donnent 92 % de tubes positifs. Donc, à 45°, tous les germes isolés ne sont pas des thermo-tolérants, sans quoi ils cultiveraient tous à 28° ; 8 % sont en fait des thermophiles vrais.

3)- Dans les souches isolées à 28°, 13 % seulement sont des souches capables de cultiver à 56° et près de 28 % à 45°. Ce sont des thermo-tolérants à thermo-tolérance plus ou moins accentuée ; 72 % sont des mésophiles vrais.

4)- 92 % des souches isolées à 45° cultivent à 28° d'une part, et d'autre part 28 % seulement des souches isolées à 28°

cultivent aussi à 45°. On a donc des répartitions différentes des souches de part et d'autre de leur optimum thermique et ce sont celles isolées à 45° qui manifestent le plus fréquemment une très large marge thermique de culture.

B- DISCUSSION ET CONCLUSIONS -

L'hypothèse que nous avions émise au Chapitre III de la troisième partie (p. 136) de l'existence de mésophiles à limite maximum de 45°, de thermo-tolérants cultivant de 28° à 56° et enfin de thermophiles à limite minimum de 45°, est confirmée par cette expérience où les souches respectivement isolées à 28°, 45° et 56° ont été réensemencées chacune pour leur part aux deux autres températures. En effet, d'après le tableau obtenu, nous pouvons constater que les souches isolées à 56° et réensemencées à 45° cultivent toutes à cett température ; le nombre maximal de germes trouvés à 45° s'explique du fait qu'il cumule le nombre des thermophiles, et celui des germes isolés à 28° susceptibles de cultiver à 45° (soit 28 % thermophiles vrais + mésophiles dont la température limite maxima est de 45°).

Ces données nous amènent à proposer la classification suivante de ces micro-organismes :

1- Les mésophiles, dont l'optimum est de 28° et le maximum ne dépasse pas 45°.

2- Les thermophiles vrais, dont l'optimum est de

56° et le minimum aux environs de 45°.

3- Les thermo-tolérants cultivant aussi bien à 28° qu'à 45° et 56°.

Ces faits, ainsi que la classification proposée, sont en harmonie avec le grand nombre de germes isolables à 45° dans les terreaux et, en même temps, fournissent une explication bactériologique satisfaisante à ce que l'on sait (CARLYLE, 1941) des processus biologiques de maturation des terreaux (naturels ou artificiels) : début de fermentation aérobie par mésophiles, montée thermique rapide, puis ralentissement de cette dernière avec nouvelle accélération de la montée thermique par suite de la fermentation par thermophiles, le très grand nombre de germes pouvant proliférer à 45° assure le relais entre les mésophiles et les thermophiles.

Ces constatations suggèrent une application pratique : l'isolement de souches à 28, 45 et 56° à partir d'un bon terreau doit nous permettre d'ensemencer de la paille ou des déchets divers et de reproduire rapidement et même diriger le phénomène de la maturation de fumiers ; les souches isolées à 45° étant les plus importantes puisqu'elles assurent le relais entre les mésophiles et les thermophiles.

Chapitre IV

ETUDE DE LA RESPIRATION

Quelques souches isolées au cours des expériences pré
dentes ont été conservées pour vérifier l'opinion de nombre
auteurs, suivant laquelle l'absorption de l'oxygène par les
germes diminue quand la température s'élève.

Nous avons recherché :

1)- l'absorption d'oxygène à 56° par des souche
différentes,

2)- l'absorption d'oxygène par une même souche
suivant la température,

3)- l'absorption d'oxygène suivant les substrat

A- DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES -

Nous ne connaissons dans ce domaine que fort peu de c
se. Les rapports des thermophiles avec l'oxygène ont bien
étudiés par quelques auteurs, mais leurs recherches concern
surtout l'aérobiose et l'anaérobiose.

IMCHENETSKY (1944), énumérant les caractères particu-

liers de ces germes, signale que la vie à une température élevée entraîne une activité croissante du métabolisme et que la cellule doit cependant se contenter de petites doses d'oxygène difficilement soluble dans un milieu de température élevée.

MICHOUSTINE (1950) souligne également que la solubilité de l'oxygène diminuant sensiblement quand la température s'élève, les formes aérobies des thermophiles doivent être adaptées à la vie dans un milieu où la tension d'oxygène est faible. Cet auteur constate cependant que les thermophiles anaérobies sont isolés moins fréquemment que les aérobies alors que la faible solubilité de l'oxygène à une température élevée devrait aboutir à la prédominance de formes anaérobies.

TECHNIQUE -

Dans notre travail, nous avons choisi de mesurer l'absorption d'oxygène gazeux qui a l'avantage d'être directement mesurable par la méthode de WARBURG.

La technique utilisée est la suivante :

- Le substrat employé est le glucose : il est utilisé à la concentration de 1 %.

- Le CO_2 est absorbé par KOH à 10 % (0,2 ml. sont placés au centre de chaque cupule, et la surface de diffusion est augmentée par une petite bande de papier filtre plongeant dans la solution).

- Les souches sont préalablement cultivées sur bouillon glucosé. La quantité de micro-organismes nécessaire étant importante, la culture se fait en fioles de Fourneau peu remplies pour que l'aération soit satisfaisante. Les germes cultivent bien et sont utilisés après 12 à 18 h. d'étuve à 56°, ou 24 h. à 45°, ou encore 36 h. à 37° suivant l'expérience à réaliser. A ce moment, la culture est centrifugée pour éliminer le bouillon et le glucose ; le culot est lavé à l'eau distillée stérile et centrifugé à nouveau. Le dernier culot obtenu est mis en suspension dans l'eau distillée stérile. Cette suspension est ajustée au colorimètre de telle sorte qu'elle contienne 2 mg. de germes en poids sec par ml. (la densité optique correspondante ayant été déterminée par un poids sec effectué sur la suspension même).

- On met stérilement dans chaque cupule 0,5 ml. de suspension (soit 1 mg. de germes) et 0,5 ml. de tampon glucosé à 2 % (soit 1 mg. de glucose par cupule).

- Le tampon employé est M/50 (tampon phosphaté à pH 7).

- Le nombre d'oscillations des cupules fixées sur les manomètres a été réglé à 100 par minute et les lectures sont faites toutes les 15 minutes pendant 2 h..

- Les expériences ayant lieu à des températures plus élevées que celles utilisées classiquement, nous avons ajouté une résistance électrique chauffante à l'appareil. Celle-ci nous a permis d'obtenir des températures correctement régulées

jusqu'à 65°.

Nous rappellerons ici, très brièvement, l'origine des souches utilisées dans cette expérience :

Souches	Origine	Milieu d'isolement
DNO_2 P-1	Puits de pétrole	Glucose-nitrate
ET_{IV}	Terreau	Extrait de terre
PP -3	Puits de pétrole	Gélatine
AB_6 -1	Terre de pâturage	Amidon

Dans ces conditions, les expériences faites nous ont permis de mesurer l'absorption de l'oxygène, d'une part à 56° par des souches différentes, et d'autre part par une même souche à des températures différentes.

RÉSULTATS -

- Absorption de l'oxygène à 56° par différentes souches.

Les souches sont d'abord cultivées à 56°, puis l'expérience en Warburg faite également à 56°. Nous avons une absorption intense d'oxygène, d'ailleurs différente suivant les quatre souches, déjà étudiées au point de vue physiologique et morphologique, et qui sont testées. Les chiffres exprimés en µ mm3 d'oxygène sont donnés dans le tableau N° 23.

TABLEAU N° 23

DNO_2 P-1	ET_{IV}	PP -3	AB_6 -1
177	145	101	40

Absorption d'O_2 en 2 heures à 56° par différentes souches.

L'observation du tableau montre que AB_6 -1 est la culture qui absorbe le moins d'oxygène, et DNO_2 P-1 celle qui en absorbe le plus. En 2 heures de respiration, AB_6 -1 absorbe le 1/4 de l'oxygène utilisé par DNO_2 P-1.

PP -3 et ET_{IV} sont intermédiaires, ET_{IV} étant plus voisine de DNO_2 P-1.

L'absorption d'oxygène semble appuyer la classification des souches AB_6 -1 et DNO_2 P-1, AB_6 -1 ne cultivant pas à 28° pourrait être classée parmi les thermophiles vrais alors que DNO_2 P-1 cultivant à 28° serait une souche thermo-tolérante. La différence d'absorption d'oxygène serait un caractère supplémentaire permettant de distinguer ces souches.

2)- Absorption d'oxygène par une même souche à des températures différentes -

Les températures étudiées sont : 28°, 37°, 45°, 56° et

Pour les températures de 37°, 45°, 56°, les souches ont été préalablement cultivées aux températures correspondantes.

Pour les températures de 28° et 65°, les souches utili-

sées cultivent très mal sur bouillon glucosé à ces températures ; dans ces deux cas, le premier passage peut se faire, la culture est maigre, mais au deuxième passage les germes ne se multiplient plus. Aussi ces souches ont été préalablement cultivées à 56° pour obtenir la masse de germes nécessaire (puisque nous travaillons évidemment toujours avec la même quantité). Nous ne pensons pas que ce changement de température ait une grande importance car nous avons constaté que si la culture a lieu à 56° pour un Warburg fait à 45° et vice-versa, les résultats sont très voisins de ceux obtenus dans le cas où la culture de la souche et le Warburg ont lieu à la même température.

Les conditions expérimentales sont les mêmes que précédemment : le glucose est toujours utilisé et la respiration est mesurée pendant 2 heures, avec lecture toutes les 15 minutes. Les résultats sont donnés dans le tableau N° 24 et les figures N°s 5 et 6.

TABLEAU N° 24

en μ mm3

Souches	28°	37°	45°	56°	65°
DNO_2 P-1	13	75	93	177	56
ET_{IV}	x	93	126	145	Très faible

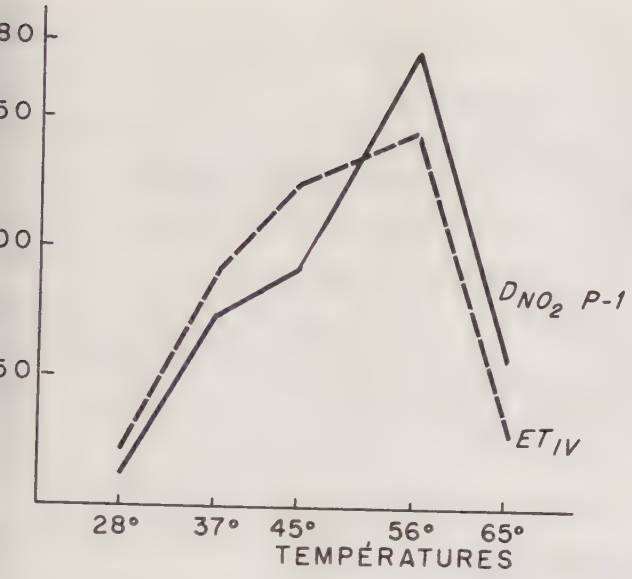
Absorption d'O_2 en 2 heures à différentes températures

Nous observons pour les deux souches un optimum thermique, pour la consommation en oxygène, à 56°. Pour DNO_2 P-1, à 37°, la consommation est à peine la moitié de celle qui se produit dans les mêmes conditions à 56° (c'est-à-dire 75 μ mm3 à 37° et 177 à 56°). Pour ET_{IV} à 37°, la consommation n'atteint pas les 2/3 de celle obtenue à 56° (93 μ mm3 en 2 heures à 37° contre 145 à 56°). Ceci indique que l'activité de ces germes est plus importante à 56° qu'à 45° et 37°, et qu'elle est extrêmement ralentie et presque nulle à 28° et à 65° (1/3 de l'absorption d'O_2 à 56° pour DNO_2 P-1). A noter ici que ces souches, d'après la classification que nous proposons page 174, seraient à classer dans les "thermophiles vrais". Cependant, on voit, une fois de plus, combien toute délimitation précise est arbitraire.

Cette augmentation de la quantité d'oxygène consommé suivant la température traduit bien l'augmentation de l'activité de ces germes. Cette augmentation d'activité est-elle en relation avec le Q_{10} ? Nous pouvons ici envisager le problème une fois de plus.

Les calculs montrent que cette augmentation est différente de la réaction classique du Q_{10} qui est en général de 2 pour une réaction biologique. Nous avons donc vu que, malgré la solubilité faible de l'oxygène à 56° (la solubilité diminue quand la température s'élève), l'activité biologique augmente. Il se peut que cette faible solubilité explique pour-

FIG. N° 5 - ABSORPTION D'OXYGÈNE.



Absorption d'O_2 à des températures différentes.

←

——— DNO_2 P-1

------ ET_{IV}

sorption d'O_2
r des souches
fférentes à 56°

→

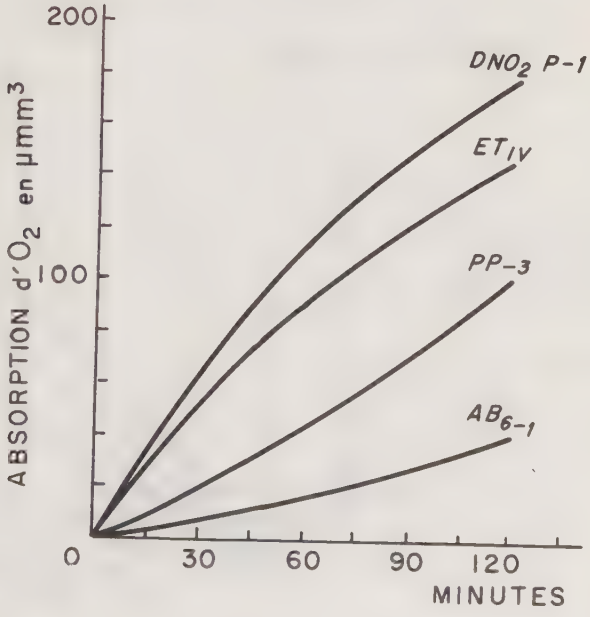
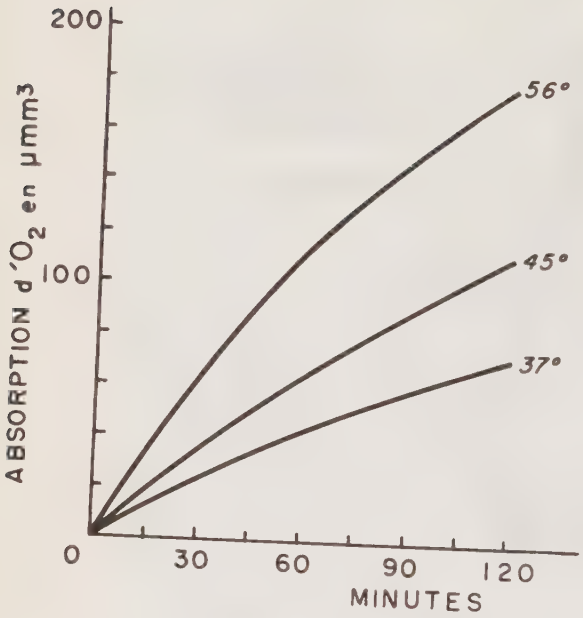


FIG. N° 6 - ABSORPTION D'OXYGÈNE.

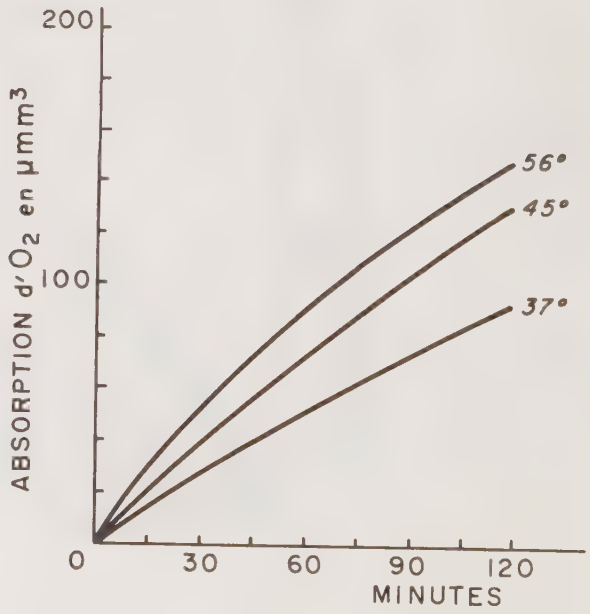


Absorption d'O_2
par DNO_2 P-1
à 37, 45 et 56°.

←

Absorption d'O_2
par ET_{IV}
à 37, 45 et 56°.

→



uoi le Q_{10} n'atteint pas 2. En effet, pour DNO_2 P-1, si à 7° nous trouvons 75 µ mm3 d'O_2 absorbé, à 56° pour une élé- ation de température de 19° (soit approximativement de 20°), 'activité devrait être multipliée par 4, nous aurions trouvé 00 µ mm3 d'O_2 ; or, nous en avons seulement 177. Avec ET_{IV}, es écarts sont plus grands encore.

férents substrats utilisés.

Toutes les conditions expérimentales étant les mêmes, ous avons cherché à étudier l'absorption d'oxygène en fonc- ion de divers substrats.

De nombreux acides aminés ont été testés : tyrosine, lycocolle, acides glutamique et aspartique, tryptophane, ystéine, etc... Tous les résultats, pour ces divers subs- rats, ont été rapportés à 100 µ mm3 d'O_2 pour le glucose (le lucose servant de témoin). Deux souches ont été testées et es résultats sont donnés dans le Tableau N° 25.

TABLEAU N° 25

Substrats	DNO_2 P-1	AB_6 - 1
Glucose	100	100
Amidon	75	127 et 105
Ac. glutamique	0 et 10	5
Ac. aspartique	3	
Tryptophane	1	
Cystéine	4	
Tyrosine	0	53
Glycocolle	8 et 24	56 et 49
Hydrolysat de caséine	110	57
Gélatine	8	54

Absorption d'oxygène suivant les substrats.
Résultats exprimés en %. Le glucose étant égal à 100.

Ce tableau nous montre que, pour DNO_2 P-1, la quanti d'oxygène nécessaire est de 110 µ mm3 pour l'hydrolysat de caséine, et 75 pour l'amidon ; par contre, elle est seulem de 10 pour l'acide glutamique, 3 pour le tryptophane et 1 pour la cystéine, etc... Les résultats sont parallèles po la souche AB_6 -1.

Donc le glucose, l'amidon et l'hydrolysat de caséine sont des substances dont le métabolisme s'accompagne d'une grande absorption d'oxygène. La cystéine, le tryptophane, l'acide glutamique, etc... au contraire ne donnent lieu qu une faible consommation d'O_2.

D- DISCUSSIONS ET CONCLUSIONS -

Ces quelques données expérimentales nous permettent visager certains aspects de problèmes encore mal résolus. Nous avons vu, en accord avec tous les auteurs, que les th philes se multiplient rapidement et que les réactions chim accompagnant leur croissance sont également plus rapides. Parallèlement, nous venons de constater que l'absorption d gène (mesurée à l'aide de l'appareil de Warburg) augmente la température jusqu'à un certain optimum, qui est ici de 56°, bien que la solubilité de l'oxygène diminue quand la température s'élève.

Pour IMCHENETSKY (1938-1944), la vitesse de la reproduction microbienne et l'activité biochimique, dans une zone déterminée de température, sont régies par la loi de VAN'T HOFF. Or si nos expériences sur l'absorption d'oxygène ont bien montré qu'une même souche absorbe des quantités de plus en plus grandes d'oxygène quand la température s'élève jusqu'à un optimum, cette augmentation de la consommation ne paraît pas aussi importante que le dit IMCHENETSKY. Il semble qu'elle ne suive pas la loi de VAN'T HOFF.

Les réactions biochimiques seraient plus rapides que chez les mésophiles, mais cette accélération due à l'élévation de la température ne suivrait pas non plus la loi du Q_{10}.

La question de la solubilité de l'oxygène, qui a été invoquée par les auteurs, n'a qu'une valeur relative et même discutable, étant donné que, à une température déterminée, dans des conditions d'aération adéquates, la quantité d'oxygène soluble qui a été consommée est remplacée très rapidement par l'oxygène de la phase gazeuse ; si le milieu est au contact de l'atmosphère, il n'y a pas de raison de supposer que la diminution de solubilité d'O_2 ralentisse la vitesse de réaction.

Enfin, les auteurs s'étonnent que les anaérobies soient isolés moins fréquemment que les aérobies. Selon eux, la faible solubilité de l'oxygène aux températures élevées devrait aboutir plutôt à la prédominance des formes thermophi-

les anaérobies ; nous venons de voir que ce facteur ne peut être invoqué de façon valable ; et de fait, nos techniques d'isolement et de numération sur gélose-extrait de terre, répartie en couche épaisse, nous ont montré que les colonies ne cultivent pas dans le fond mais se concentrent près de la surface. Tout nous indique donc que nous avons plutôt affaire à des aérobies et à des micro-aérophiles.

Enfin, nous rappellerons que la respiration varie avec le substrat fourni aux thermophiles et sur un même substrat avec la souche utilisée.

CINQUIÈME PARTIE

SUR L'ORIGINE

DES MICRO-ORGANISMES THERMOPHILES.

CINQUIÈME PARTIE

SUR L'ORIGINE DES MICRO-ORGANISMES THERMOPHILES

L'ensemble de nos résultats permet peut-être d'apporte une contribution au problème très général de l'origine des thermophiles. Nous sommes conduite à imaginer que ces germes particuliers ont pour foyer les fumiers, où ils se multiplient et se développent. Ils se maintiennent dans les terreaux qui, par leur matière organique et leur humidité, constituent un milieu favorable. Ils se rencontrent dans les terres cultivées (terres de jardin, terres de grande culture, etc...), terres qui sont contaminées par les matières fécales animales. Ils sont répartis dans le monde entier par des facteurs atmosphériques comme les vents et les déjections animales, en particulier d'oiseaux, et existent ainsi dans les régions où la température ne semble pas en rapport avec leurs possibilités de vie et où le fumier n'est pas intervenu.

Bien que le but de nos expériences n'ait pas été de rechercher l'origine des micro-organismes thermophiles, certaines données permettent de discuter le problème par rapport aux diverses théories émises.

1/- Une théorie que nos conclusions ne nous permettent ni d'affirmer ni d'infirmer est l'hypothèse qui considère ces organismes comme des formes relictuelles, c'est-à-dire des descendants de germes ayant existé à la surface du globe quand la température y était plus élevée.

2/- La théorie qu'il nous est plus difficile d'accepter à la lumière de nos expériences est la théorie adaptative de MICHOUSTINE.

Rappelons que la plupart des chercheurs soviétiques considèrent les thermophiles comme des formes de microbes mésophiles qui se sont adaptés aux conditions du milieu, c'est-à-dire à la vie à une température élevée. La modification du milieu est considérée, dans ce cas, comme la cause initiale des changements devenus héréditaires.

Les idées phylogénétiques sur l'origine des thermophiles émises par MICHOUSTINE sont difficiles à discuter étant donné l'instabilité de la morphologie et de la physiologie des microbes.

Pour appuyer sa théorie, MICHOUSTINE a cité les expériences de IMCHENETSKY et LOGUINOVA (1944-1948). Ces auteurs ont cherché à déterminer les conditions conduisant à l'apparition rapide des formes microbiennes désirées ; IMCHENETSKY pense que, sous l'influence de températures supra-optimales, apparaissent dans la culture des cellules capables de se développer aux températures élevées. Si les propriétés des

cellules nouvelles concordent avec le milieu extérieur, ce dernières s'avèrent être plus viables que les cultures de départ. MICHOUSTINE conclut : "Le milieu crée et favorise une certaine direction du processus de mutation. Les micr organismes mésophiles, dans des conditions favorables, peu vent être transformés en thermophiles. Il faut pourtant souligner que le processus est pénible et lent, et que nou ne connaissons pas de moyens pour l'accélérer".

Mais les idées de MICHOUSTINE ne sont pas admises pa tous et les essais tentés par divers auteurs pour adapter certains germes à une température plus élevée que leur tem pérature normale de culture n'ont jamais apporté de résult convaincants.

C'est ainsi que des expériences effectuées dès 1895 par DIEUDONNÉ (comme nous l'avons signalé dans l'introduct ne réussirent qu'a augmenter le maximum thermique des sou- ches de 4 à 5°.

Par la même méthode, TZIKLINSKAJA obtient une race d B. subtilis dotée d'un maximum thermique de 8° plus élevé celui de la culture de départ.

GAGE et STROUGHTON, en 1906, ont obtenu une race the résistante de B. coli et MAGOON, en 1926, a abouti au même résultat avec B. mycoïdes. Mais a-t-on une adaptation ou une mutation suivie de sélection ?

KROHN, en 1923, montre que les thermophiles de NEGRE

ayant un optimum thermique de 50° avaient, après deux années de culture, porté ce maxima à 62° C.

Dans la plupart de ces travaux, l'adaptation des microbes aux températures élevées se fait donc très lentement.

Il est d'autres travaux qui montrent que l'augmentation progressive de température se révèle parfois inopérante pour obtenir des formes thermo-résistantes de micro-organismes. C'est ainsi que CASMAN et RETTGER, en 1933, n'ont obtenu aucun résultat avec cette méthode appliquée pendant un an.

Un autre argument contre l'hypothèse de MICHOUSTINE est que la réversion des formes thermophiles et thermo-tolérantes en formes mésophiles est également difficile. Le fait avait été signalé par DIEUDONNÉ en 1895 et par GOLIKOVA en 1926.

3/- Nos recherches nous ont permis de constater que la richesse en germes thermophiles est plus ou moins parallèle à la fumure, à la teneur en matière organique et en eau ; par contre, elle est indépendante de la température de ces terres. Il nous semble donc difficile d'admettre l'hypothèse de MICHOUSTINE qui accepte l'adaptation des mésophiles aux températures élevées. Si l'hypothèse de l'adaptation est réelle, nous devons retrouver la répartition des thermophiles suivant des zones climatiques, comme NEGRE l'a suggéré ; or, ceci est en contradiction avec nos résultats et aussi avec ceux obtenus par MICHOUSTINE lui-même. Un argument peut cependant nous être opposé : la sècheresse de certaines régions empêche-

à la développement de ces germes.

Il nous semble que, dans la plupart des cas, l'origine des thermophiles dans la nature proviendrait des fumiers ou d'un point d'ordre fécal. La richesse plus ou moins abondante en thermophiles en fonction de la teneur plus ou moins grande en fumier semble apporter un argument de poids : une terre peu fumée contient moins de germes thermophiles qu'une terre qui a été fréquemment et abondamment fumée.

L'hypothèse d'une adaptation en retour des thermophiles à la vie des microbes mésophiles ne semble pas vérifiée dans nos expériences. Le résultat des analyses de terre provenant de zones très froides où l'élévation de température à la zone thermophile ne se réalise jamais a montré leur présence : ceci nous indique qu'ils n'ont su s'adapter pour devenir mésophiles.

Par contre, la théorie des mutations proposée par KLUYVER et BAARS (1932) paraît intéressante. Selon cette théorie, dans les cultures de mésophiles apparaissent spontanément des cellules mutantes capables de se multiplier dans les zones de températures élevées. L'apparition des cellules avec de nouveaux caractères se fait indépendamment des conditions du milieu extérieur Ces cellules engendrent des races thermo-résistantes des microbes correspondants. KLUYVER et BAARS rapportent des expériences démontrant l'apparition, dans des cultures de bactéries mésophiles, de cellules qui se développent à température élevée. Pour ces auteurs, les thermophiles sont des mutants apparaissant facilement dans

les milieux nutritifs de laboratoire. Ce point de vue a été adopté après l'étude de Vibrio thermodesulfuricans provenant probablement de Vibrio desulfuricans. On peut ajouter que dans les conditions expérimentales de MICHOUSTINE et IMCHENETSKY, l'explication est aussi plausible si l'on adopte la théorie mutationniste, d'autant plus que ces auteurs opèrent à des températures supra-optimales favorisant la sélection des mutants tolérant une température élevée.

Donc, à la lumière de nos recherches, il semble qu'à côté de l'hypothèse considérant le groupement des thermophiles comme un reliquat, ces germes puissent être considérés comme ayant leur point de départ dans les populations bactériennes mésophiles où, suivant l'hypothèse de KLUYVER et BAARS, une élévation de température sélectionnerait les mutants. Ce phénomène serait surtout important dans les fumiers et les composts : là, nous avons un foyer où le nombre des germes thermophiles augmente considérablement.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

C O N C L U S I O N S G É N É R A L E S

Les conclusions générales que nous pouvons tirer de nos expériences se rapporteront :

1- aux techniques,

2- aux sols étudiés,

3- à l'écologie et aux facteurs de répartition,

4- aux groupements fonctionnels et à la pluri-valence des souches,

5- à l'équilibre thermophiles - mésophiles,

6- à la classification des bactéries thermophiles,

7- à la morphologie,

8- aux caractères culturaux,

9- à l'isolement et aux caractères des souches pures,

10- à l'étude de la respiration à différentes températures,

11- au cas des terreaux et des sols désertiques,

enfin 12- à l'origine de ces micro-organismes.

)- Les techniques -

L'étude des Bactéries thermophiles a nécessité tout

d'abord la mise au point de techniques appropriées ; celles de la Microbiologie générale étant peu favorables à leur culture, nous avons conservé le principe des méthodes de la Microbiologie du sol en les adaptant aux nouvelles conditions de culture, c'est-à-dire aux températures élevées.

Bien que nos techniques soient critiquables et que nous sachions que les résultats obtenus ne donnent pas réellement une valeur absolue, mais surtout comparative, elles présentent cependant des avantages sur les techniques anciennes.

a)- Les milieux supportent un séjour prolongé à l'étuve (environ 10 jours aux températures de 55-60°), ce qui permet d'obtenir tous les germes cultivant sur le milieu, aussi bien les germes à croissance rapide que ceux à croissance lente, et d'avoir ainsi une répartition quantitative plus correcte que précédemment des bactéries thermophiles dans les sols.

b)- Nous pouvons apprécier qualitativement et quantitativement les fonctions exercées par ces germes, étudier leur répartition et l'activité des groupements microbiens physiologiques.

c)- Nos techniques étant calquées sur celles qui sont utilisées en microbiologie du sol pour les mésophiles, elles permettent une comparaison aisée des deux groupements : thermophiles et mésophiles.

d)- Nos techniques sont essentiellement écologiques, donc beaucoup plus appropriées pour l'étude des bactéries thermophiles telluriques.

2)- Sols étudiés -

Les techniques décrites ont été utilisées pour analyser un certain nombre d'échantillons choisis aussi différents et aussi variés que possible. Ce sont surtout des sols cultivés ayant perdu leurs différenciations pédologiques, comme le montre la liste ci-dessous :

a)- En France : des terreaux et fumiers, des terres de jardin (prélevées à des horizons différents), des terres de grande culture, des prairies, des terres de vignobles, sables de la région parisienne, des plages du Sud-Ouest, l'alios des Landes, "carotte" de puits de pétrole de la même région.

b)- De nombreux prélèvements proviennent du Sahara : dune, hamada, daïa, un sol irrigué de palmeraie, sol non irrigué hors de palmeraie, sol nu sans végétation, sol irrigué avec culture de sorgho, même sol non irrigué et sans végétation.

c)- De l'Afrique Equatoriale, nous avons obtenu : des terres de pâturage, terre en jachère, terre vierge, champ d'arachides, etc...

d)- Un limon du Nil (Egypte) a été analysé.

e)- Enfin de l'Antarctique, un prélèvement des Iles Pétrels a été examiné.

Sur les trente-deux prélèvements effectués, nous avons fait des analyses microbiologiques et nous avons complété nos données par quelques dosages chimiques nécessaires à la carac-

térisation biologique des types de sols.

Au point de vue bactériologique, nous avons étudié la microflore totale en milieu liquide et en milieu solide, la fixation en aérobiose (Azotobacter) et en anaérobiose (Clostridium), la nitrification (en recherchant les germes nitreux et les nitriques), la protéolyse, la dénitrification, la cellulolyse (en aérobiose et en anaérobiose), l'hémicellulolyse, l'amylolyse, la réduction des sulfates.

Pour la numération, le nombre de germes est calculé suivant la technique de Mc CRADY, et les courbes d'activité des différents groupements sont tracées en calculant la dilution atteinte chaque jour (suivant la technique de REED et MUENCH).

Enfin des dosages chimiques concernant la quantité de matière organique, la teneur en eau, en carbone, en azote (ce qui nous permet de calculer le rapport C/N) et également la proportion de matières humiques.

3)- Ecologie et facteurs de répartition -

La numération de la microflore totale thermophile nous montre que ces germes sont répartis très inégalement suivant les échantillons. Très nombreux dans les terreaux, ils sont rares dans les sables. Des terreaux nous donnent de 35 à 140 millions de bactéries thermophiles alors que certains sables du Sahara ne donnent que quelques centaines de germes

par gramme de prélèvement. Ceci nous a permis de classer les sols en échantillons : très riches, moyennement riches, et pauvres.

Exemples :	Très riches	terreau (TP)	35.000.000 g/g.
		terre de jardin (G)	1.900.000 -
	Moyennement riches	terre de prairie (L)	10.000 -
		terre de vigne (E)	2.600 -
	Pauvres	sable du Sahara (S)	35 à 275 -
		Antarctique (IP)	50 -

Nous avons constaté que la température n'influe pas sur leur nombre. Les régions les plus chaudes ne sont pas celles où ces germes sont les plus nombreux. Nous sommes donc loin des opinions de NEGRE et de KRUYFF qui les considéraient comme les germes des régions chaudes, en particulier du Sahara ou des régions méridionales. Nous sommes plus près des opinions de MICHOUSTINE, pour qui les thermophiles sont les germes des terres cultivées.

Mais les facteurs de répartition sont, pour nous, plus nombreux et plus complexes. En dehors de la fumure, qui est un élément essentiel, nous accordons un grand rôle à la présence de matière organique et à la teneur en eau des sols.

Les groupements fonctionnels - Plurivalence des souches -

Ces germes très répandus ont des fonctions diverses : nos techniques nous ont permis de mettre en évidence la pro-

téolyse, la dénitrification, l'amylolyse, l'hémicellulolyse, la cellulolyse et la réduction des sulfates ; deux autres fonctions ont cependant toujours été absentes : la fixation de l'azote en aérobiose et en anaérobiose, la nitrification.

En ce qui concerne la fixation de l'azote en aérobiose, nous n'avons pu obtenir à 56° la multiplication des Azotobac pourtant présents dans certains échantillons. En anaérobiose nous avons observé parfois un début de multiplication, mais l passage suivant restait stérile. Nous devons signaler les er reurs possibles dues tant à la dissolution dans le milieu de culture de l'ammoniac atmosphérique qu'à la méconnaissance de bactéries oligonitrophiles, erreurs qui ont pu faire croire à certains auteurs à l'existence de fixateurs thermophiles.

Quand aux différentes fonctions rencontrées, la protéolyse est la plus importante : le nombre de germes protéolytiques d'un échantillon suit de près celui de la microflore totale.

L'amylolyse est également une fonction très répandue et très active, mais les amylolytiques sont cependant moins nombreux que les protéolytiques. Les bactéries cultivant sur le milieu glucose-nitrate sont, en nombre, aussi importantes que les bactéries amylolytiques.

Moins de germes attaquent les hémicelluloses. Enfin, la cellulolyse en aérobiose est rare. Les germes hydrolysant la cellulose en anaérobiose et les sulfato-réducteurs sont

plus nombreux, mais ne se rencontrent cependant qu'aux premières dilutions.

Nous trouvons donc, dans un échantillon très riche en bactéries thermophiles, diverses fonctions qui sont, par ordre d'importance décroissante :

1)- la protéolyse,

2)- l'amylolyse et la dénitrification,

3)- l'hémicellulolyse,

4)- la cellulolyse et la réduction des sulfates.

Ces dernières fonctions disparaissent dans les échantillons pauvres en germes thermophiles.

Sur une centaine de souches isolées en cultures pures, à partir de milieux électifs, nous avons tenté l'ensemencement sur les autres milieux : nous avons ainsi montré la très grande fréquence des souches douées de plusieurs activités. Nous avions supposé l'existence de ce caractère, déjà connu chez les mésophiles, en comparant le nombre de germes trouvé pour chaque fonction au nombre de germes représentant la microflore totale de l'échantillon.

Les facteurs de répartition sont les mêmes que ceux qui dirigent la répartition des bactéries thermophiles prises globalement, c'est-à-dire la fumure, la matière organique et l'eau. Dans un échantillon riche en matière organique, dont la teneur en eau est importante, et fumé régulièrement, le nombre des thermophiles est grand ; les protéolytiques sont les mieux représentés, puis viennent les amylolytiques, les

dénitrificateurs, les cellulolytiques et les sulfato-réducteurs dont le nombre va décroissant. Dans les échantillons de plus en plus pauvres, ces dernières fonctions disparaisse progressivement et l'ultime est la protéolyse.

5)- Equilibre thermophiles/mésophiles -

L'équilibre thermophiles/mésophiles telluriques, probl me peu étudié jusqu'à ce jour, a pu être précisé grâce à l'e ploi de nos techniques.

De nos numérations, il ressort que le rapport des ther mophiles aux mésophiles varie de 1/10 à 1/50.000 pour les di vers types de sols. Nous constatons qu'un terreau riche en thermophiles donnera un rapport de 1/10 environ, alors qu'un terre de jardin ou de grande culture donnera 1/100.

Nous avons ensuite recherché la courbe de répartition germes dans un sol suivant leur optimum thermique. Nous tro vons deux maxima : l'un à 30°, le second à 45°. Cet optimum à 45° est important, surtout dans le cas des terreaux. Il y a donc un optimum de croissance à 30° pour les mésophiles. L'optimum observé à 45° nous suggère l'hypothèse suivante : à cette température, nous trouvons des mésophiles dont la température limite supérieure est 45°, des thermo-tolérants cultivant de 28° à 56°, enfin des thermophiles vrais dont la température minimale de culture descend à 45°.

Cette hypothèse est vérifiée par les travaux suivants après isolement de souches, à partir d'un terreau, aux tempe

ratures de 28°(*), 45° et 56°, chacune de ces souches a été réensemencée aux deux autres températures, ce qui nous a permis de constater les températures limites de culture des différentes souches.

Les souches isolées à 56° cultivent à 45°, et leur température minimale de culture est aux environs de 40° comme le montre l'examen des courbes de numération. Parmi les souches isolées à 45°, toutes cultivent bien à 56° et 92 % seulement se multiplient à 28°. Dans le cas des souches isolées à 28°, 28 % cultivent à 45° et 13 % seulement à 56°.

Ceci paraît bien démontrer qu'à 45° nous avons les thermophiles, les thermo-tolérants et 15 % de mésophiles (28-13) dont le maximum est d'environ 45°.

Classification des bactéries thermophiles -

De ces données, nous tirons une classification simple et pratique de ces micro-organismes :

- Les mésophiles, dont l'optimum est 28° et le maximum ne dépasse pas 45° ;

- Les thermophiles vrais, dont l'optimum est 56° et le minimum aux environs de 45° ;

- Les thermo-tolérants, qui cultivent aussi bien à 28° qu'à 45° et 56°.

(*)- Nous avons vu p. 171 les raisons pour lesquelles nous considérons comme équivalentes les températures de 28 et 30°.

7)- Morphologie -

Nos souches ne comportent que des formes bacillaires à modes de groupement divers : isolés, par paire ou en chaînette ; il est possible également de rencontrer des formes filamenteuses. Mais nous n'avons trouvé ni cocci ni vibrions.

8)- Caractères culturaux -

Nous n'avons pu confirmer la formation en 24 h. de colonies géantes constatée par MICHOUSTINE. Sur gélose extrait de terre, nous avons, au contraire, des colonies petites dont l'apparition peut être tardive (3 à 4 jours). De ce côté, nos observations rejoignent celles de LOGUINOVA pour qui l'adaptation aux températures élevées aboutit à une diminution de la taille des colonies.

La rapidité de multiplication de ces organismes entraîne une accélération des phénomènes biologiques ; ces données ont été faciles à déterminer puisque nous avons des milieux de composition identique pour les mésophiles et les thermophiles.

Nous constatons également, au cours des analyses d'un même échantillon faites à des températures différentes, l'absence de phase de latence au début des cultures à 56° alors qu'elle apparaît à des températures plus basses et devient de plus en plus importante au fur et à mesure que la température baisse.

9)- Isolement et caractères de souches pures -

Parmi les souches isolées à 56°, nous en avons étudié

cinq pour lesquelles nous avons déterminé de façon précise les caractères culturaux.

Bien que la classification de ces germes rencontre de grandes difficultés, nous avons tenté de les identifier à l'aide du Manuel de BERGEY et du Traité de Systématique bactérienne de PREVOT. Cependant, de grandes réserves doivent être faites à ce sujet.

La souche AT-10 appartiendrait au genre Bacillus et les quatre autres souches (ET_{IV}, DNO_2 P-1, AB_6-1 et PP -3) au genre Achromobacter.

ude respirométrique à différentes températures -

Nous avons signalé précédemment que les thermophiles sont des germes qui se multiplient rapidement et dont les réactions chimiques sont de ce fait accélérées.

L'absorption d'oxygène étudiée sur diverses souches pures varie suivant celles-ci et, surtout, elle augmente quand la température s'élève jusqu'à un optimum qui est de 56° pour nos souches et diminue ensuite.

Pour IMCHENETSKY, la vitesse de reproduction et l'activité biochimique dans une zone déterminée de température sont régies par la loi de VAN'T HOFF. Nous n'étions pas d'accord sur ce point puisque, pour nous, les différentes activités de ces germes ne sont multipliées que par 2 ou 3 par rapport aux mésophiles (écart thermique de 28°). La consommation d'O_2 nous permet de confirmer nos données : les réactions sont plus rapi-

des que chez les mésophiles, mais ne suivent pas le Q_{10}.

11)- Cas des terreaux et des sols désertiques -

Deux types précis d'échantillons aux caractères parti lièrement nets (et d'ailleurs opposés) méritent d'être indi dualisés : les terreaux d'une part, les sables du Sahara d' tre part.

Les terreaux sont des échantillons riches en matière ganique, et en humus, de teneur en eau élevée, et dont le r port C/N est important. Toutes les fonctions sont bien rep sentées et atteignent rapidement des dilutions élevées. Le bactéries thermophiles sont nombreuses et le rapport thermo philes/mésophiles est élevé : 1/10.

Les sables du Sahara sont pauvres en matière organiqu en humus ; la teneur en eau est très variable et dépend du de prélèvement : terres irriguées (par exemple, prélèvement bord d'un drain dans une palmeraie) ou terres non irriguées La teneur en carbone et en azote est très faible. Parallèl ment, le nombre de bactéries thermophiles est peu élevé, pe de fonctions sont représentées : souvent, seule la protéoly existe, les germes amylolytiques et les dénitrificateurs so rares.

Quant au rapport thermophiles/mésophiles, il semble e relation avec la teneur en eau : la baisse de la teneur en entraîne une diminution du nombre des thermophiles, mais ce

influence s'exerce dans le même sens et avec plus d'intensité encore sur les mésophiles, si bien que la dessiccation d'un sol entraîne une augmentation du rapport thermophiles/mésophiles.

Nous retrouvons ici les conclusions de KILLIAN et FEHER : "Malgré la teneur minime en eau des sols désertiques et malgré les températures extrêmement élevées auxquelles ils sont exposés, ils renferment toujours des microorganismes à l'état de vie active".

- Bien que le but de nos recherches ne concerne pas l'origine des microorganismes thermophiles, les résultats nous permettent d'apporter une contribution à ce problème. Si nous ne pouvons ni confirmer ni infirmer l'hypothèse qui considère ces organismes comme des formes relictuelles, nous pouvons apporter quelques critiques à la théorie adaptative de MICHOUSTINE et penser que ces germes peuvent être considérés comme ayant leur point de départ dans les fumiers où, suivant l'hypothèse de KLUYVER et BAARS, l'élévation de température sélectionnerait les mutants chez les mésophiles. Là, nous avons un foyer où le nombre de thermophiles est important. Ces germes sont répartis dans la nature par la fumure, les déjections animales et les facteurs atmosphériques comme les vents.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

AMBROZ, A., 1910-1911 - Uber das Phänomen der Thermobiose beiden Mikroorganismen. Zentr. Bakt. Parasitenk. Bakt. Parasitenk. Infekt., II, 37, 3-16.

AMBROZ, A., 1913 - Denitrobacterium thermophilum sp. nov. Ein Beitrag. zur Biology der thermophilen Bacterien. Zbl. f. Bakt., 2 Abt. 37, 3.

ARRHENIUS, S., 1927 - Die thermophilen Bakterien und der Straklungsdruck der Sonne. Z. physik. Chem., 130, 516-519.

AUGIER, J., 1956 - A propos de la numération des Azotobacter en milieu liquide.- Ann. Inst. Pasteur, 91, 759.

AUGIER, J., 1956 - Recherches sur la mesure de l'activité hémicellulolytique des sols.- Ann. Inst. Pasteur, 90, 161.

AUGIER, J., 1957 - A propos de la fixation biologique de l'azote atmosphérique et de la numération des Clostridium fixateurs dans les sols.- Ann. Inst. Pasteur, 92, 817.

BARDOU, P., 1907 - Etude biochimique de quelques bactériacées thermophiliques et de leur rôle dans la désintégration des matières organiques des eaux d'égout. - Thèse de Pharmacie de l'Université de Lille, 1906. Zbl. Bakt. 1 Abt., ref. 39, 744.

de) BARJAC, H., 1952 - La puissance dénitrifiante du sol. Mise au point d'une technique d'évaluation.- Ann. Inst. Pasteur, 83, 207.

de) BARJAC, H., et CHALVIGNAC, M.A., 1954 - Nouvel essai sur la détermination du pouvoir amylolytique.- Ann. Inst. Pasteur, 87, 84.

BERGEY, D., 1919 - Thermophilic bacteria.- J. Bact., 4, 304.

BERGEY, D., and al., 1957 - Manual of determinative bacteriology.- Williams and Wilkins., Baltimore, 7 th. Ed.

BLACK, L., and TANNER, F., 1928 - A study of thermophilic bacteria from intestinal tract.- Zbl. f. Bakt., 2 Abt. 75, 360.

BONFILS, P., et FAURE, J., 1955 - Etude comparative des sols du C.R.A. de Bambey.- Annales du Centre de Recherches Agronomiques, Bambey, Sénégal.

BRISBANE, P.G., and ROVIRA, A.D., 1961 - A comparison of methods for classifying Rhizosphere Bacteria.- J. Gen. Microbiol., 26, 379, 392.

BUTTIAUX, R., 1961 - Pseudomonas non pigmentés et Achromobac
ter.- Colloque annuel de la Société Française de
Microbiologie. Ann. Inst. Pasteur, Supplément a
N° 6, Juin 1961, 43.

CAMERON, E.J., and WILLIAMS, C.C., 1928 - The thermophilic
flora of sugar in its relation to canning.-
Zbl. f. Bakt. 2 Abt., 76, 28. J. Bact., 15, 31.

CAMERON, E.J., and BIGELOW, W.D., 1951 - Elimination of ther
mophilic bacteria from sugar.- J. Ind. Eng. Chem
23, 1330-1333.

CAMPBELL, E.G., 1932 - A thermophil nitrit former.- Science,
75, N° 693, 22.

CARLYLE, R.E., and NORMAN, A.G., 1941 - Microbial thermogene
sis in the decomposition of plants materials.-
Part. II - Facteurs involved.- J. Bact., 41, 699

CASMAN, E.P., and RETTGER, L.F., 1933 - Limitation of bacter
growth at higer temperatures.- J. Bact., 26, 77

CHALVIGNAC, M.A., 1956 - A propos de la numération de la flo
re totale tellurique. Technique en milieu liqui
de.- Ann. Inst. Pasteur, 91, 602.

CHALVIGNAC, M.A., 1957 - Répartition et polyvalence des grou
pements physiologiques au sein de la microflore
totale du sol.- Ann. Inst. Pasteur, 92, 705.

COPPIER, O., et de BARJAC, H., 1952 - De la richesse d'un s
en microorganismes nitrificateurs.- Ann. Inst.

Pasteur, 83, 118.

ION, S., and FEIRER, W., 1925 - Anaerobic sporulating thermophiles.- J. Bact., 10, 37.

CUDONNE, A., 1895 - Beiträge zur kenntnis der Anpassungsfähigkeit der Bacterien an ursprünglich umgünstige temperatur verhältnisse.- Zbl. f. Bakt., 16, 965 ; Biol. Zbl., 15, 103.

ROVA, A.A., 1938 - Bacteries thermophiles dans les régions arctiques.- A.C. Sc., URSS, n° 8, 647 - Ext. in Bot. Zbl., 35, 310, 1941.

ION, L., 1924 - A thermophilic sulfat-reducing bacteria.- Zbl. f. Bakt., 2 Abt., 63, 58.

RER, W.A., 1927 - Studies on some obligate thermophilic bacteria from soil.- Soil Sc., 23, 47.

E et STROUGHTON, 1906 - in "Microorganismes thermophiles dans la nature et la pratique", MICHOUSTINE, E.N., Ed. Acad. Sci. URSS (Moscou-Léningrad).

DEFROY, Ph., DEBOMBYNES, 1955 - Observations sur la couverture du sol (Bambey) - Annales du Centre de Recherches agronomiques de Bambey, Sénégal.

GHRAM, E.R., 1947 - The thermophilic microorganisms.- Bacteriol. Reviews, 11, 3, 189.

BIG, D., 1888 - Uber Bakterienwachstum bei 50° bis 70°. - Ztschr. f. Hyg., 3, 294, 322.

GOLIKOVA, S.N., 1926 - Zur Frage der termobiose.- Zentr. B
Parasitenk Infekt. II, 69, 178-185.

HANSEN, P.- The growth of thermophilic bacteria.- Archiv.
Mikrobiol., 4, 23-35.

IMCHENETSKY, A.A., 1941 - Biochemical activities of thermo
lic bacteria.- C.R. Acad. Sci. URSS, 30, 671.-
Chem. Zent., 113, 2705, 1943.

IMCHENETSKY, A.A., 1942 - La vitesse des processus provoqu
par les thermophiles et les mésophiles.- Micro
biologija, 10, 4, 385.

IMCHENETSKY, A.A., 1944 - Processus microbiologiques aux t
ratures très élevées.- A.N., URSS.

IMCHENETSKY, A.A., et SOLVCENA, L.I., 1945 - The growth of
aerobic thermophilic bacteria.- J. Bact., 49,
539.

JAMES, N., 1958 - Soil Extract in Soil microbiology.- Cana
J. Microbiol., 4, 363.

KILLIAN, Ch., et FEHER, D., 1939 - Recherches sur la micro
logie des sols désertiques.- Encyclopédie biol
que XXI, Edition Le Chevalier.

KLUYVER, A.J., and BAARS, J.K., 1932 - On some physiologic
artefacts.- Proceeding of the section of Scien
Koninklijke Academie van Wetenschappen te Amst
dam, 370.

ROHN, V., 1923 - Studien über thermophile Schizomyceten.- Ann. Acad. Sci. Fennicoe, A, 21, 1-25.

E KRUYFF, E., 1909 - Les bactéries thermophiles dans les tropiques.- Bull. de départ. de l'agric. aux Indes néerlandaises. Microbiol. 4, 30. Zbl. f. Bakt. 2 Abt. 26, 65, 1910 ; 34, 65, 1913.

AJUDIE, J., et CHALVIGNAC, M.A., 1956 - Appréciation de l'activité protéolytique de la microflore du sol.- Ann. Inst. Pasteur, 90, 359.

LESKE, R., 1921 - Morphologie und Biologie der Strahlenpilze, Leipzig.

OGUINOVA, L.G., 1960 - Physiologie des levures thermophiles obtenues par voie expérimentale.- Ed. Acad. Sci. URSS, Moscou.

AGOON, C., 1926 - Increasing resistance to heat through selection.- J. Inf. dis., 38, 429.

EDARIS, E.A., 1931 - Media for the enrichment and cultivation of thermophilic anaerobes.- Thesis for M.A. Degree University of Texas Austin.

ICHOUSTINE, E.H., 1935 - Les bactéries thermophiles et leurs rapports avec l'état de culture des terres.- Chimizacia Soc. Zemle Delia 6, 55.

ICHOUSTINE, E.H., 1947 - Les microorganismes thermophiles et leur répartition dans la nature.- Microbiologija,

16, 2, 177.

MICHOUSTINE, E.N., 1950 - Les microorganismes thermophiles dans la nature et la pratique.- Ed.ACad. Sci. URSS (Moscou-Leningrad), 391.

MICHOUSTINE, E.H., et VASSILIEVA, O.N., 1945 - Les causes de la répartition des microorganismes thermophiles. Microbiologija, 14, 4, 234.

MIEHE, H., 1907 - Thermoïdium sulphureum, n.g.n. sp., ein neuer wärmepilz.- Ber. botan. Ges. 25, 510-515.

MIQUEL, P., 1879 - Monographie d'un bacille vivant au-delà de 70°.- Ann. Microg. 1, 3, 10.

MIYOSHI, M., 1897 - Ueber das massenhafte Vorkommen von Eisenbakterien in den thermen von Ika●.- J. Coll. Sci. Imp. Univ. Toky●, 10, 139-142.

MIYOSHI, M., 1897 - Studien über die Schwefelrasenbildung und die Schwefelbakterien der Thermen von Yumoto bei Nikko.- J. Coll. Sci. Imp. Univ. Toky●, 10, 143-170.

MORRISON, L.E., 1921 - Studies on thermophilic bacteria.- Thesis for degree of master of science at University of Illinois.

MORRISON, L.E., and TANNER, F.W., 1924 - Studies on thermophilic bacteria from 1 Aerobie thermophilic bacteri from water.- Jour. f. bact. 7, 343, 1922.- Bot.

Gaz., 77, 171, 1924.

MORRISON, L.E., and TANNER, F.W., 1922 - Aerobic thermophilic bacteria from water.- J. Bact., 7, 343-366.

NEGRE, L., 1913 - Thermophilic bacteria from the water of Figuig. Zbl. f. Bakt. 2 Abt., 39, 149. C.R. Soc. biol., 74, 867, 1913.

NEGRE, L., 1913 - Bactéries thermophiles des sables du Sahara. - C.R. Soc. biol., 74, 814.

POCHON, J., et coll.- Manuel technique d'Analyse Microbiologique du sol.- Masson et Cie, Editeurs, 1954, p. 123.

PREVOT, A.R., 1961 - Traité de Systématique Bactérienne.- Tome II, Dunod (Editeur), p. 771.

PRINGSHEIM, H., 1911 - Ober die Assimilation des Luftsickstoffs durch thermophile Bakterien.- Zentr. Bakt. Parasitenk. Infekt., II, 31, 23-27.

RABINOWITCH, L., 1895 - Uber die thermophilen Bakterien.- Z. Hyg. Infektionskrankh, 20, 154-164.

REED, H.J., et MUENCH, H., 1938 - A simple method of estimating fifty per cent endpoint.- Am. J. Hyg., 27, 493.

RUSSELL, H.L., et HASTINGS, E.G., 1902 - A micrococcus, the thermal death limit of which is 76°.- Zbl. f. Bakt. 2 Abt., 72, 193 ; 70, 214.

SCHILLINGER, A., 1898 - Uber thermophile Bakterien.- Hyg. Rund., 8, 568.

Van TIEGHEIM, P., 1881 - Sur les bactériacées vivant à température de 74° C.- Bull. Soc. bot. d. France, 28, 35.

TIRELLI, E., 1907 - I termofili delle acque potabili.- Zbl. f. Bakt., 2 Abt., 19, 328.

TZIKLINSKAJA, P.V., 1903 - Les microbes thermophiles.- Roussk. Arch. Path., 5, 678.

WAKSMAN, S., CORDON, T., and HULPOI, N.- Influence of temperature upon the microbiological population and decomposition processes in composts of stable manure.- Soil Sci., 47, 83.

ZIEMIECKA, I., 1934 - The use of a modified Rossi-Cholodny technique for studying the organisms that decompose certain organic compounds in soil.- Zbl. f. Bakt. 2 Abt., 91, 379.

La bibliographie concernant les bactéries thermophiles étant très importante, nous n'avons mentionné que les articles dont les auteurs ont été cités dans notre travail.

Nous devons signaler également que nous n'avons pas obtenu toutes les publications russes désirées et que nous n'avons eu que des traductions parfois très résumées des autres. Les références de ces articles ont été traduites du russe.

T a b l e des M a t i è r e s

	Page
INTRODUCTION.	1
PLAN DES RECHERCHES.	10
EXPOSE DES RECHERCHES.	13
Ière PARTIE : LES TECHNIQUES.	14
- Les techniques anciennes.	16
- Critique des techniques anciennes.	20
- Mise au point des techniques.	23
- Conclusions.	49
2ème PARTIE : FICHES SIGNALETIQUES DES ECHANTILLONS.	51
- Prélèvements recueillis en France.	54
- Prélèvements provenant du Sahara.	70
- Prélèvements provenant d'Afrique Equatoriale.	81
- Prélèvement recueilli en Egypte.	87
- Prélèvement provenant de l'Antarctique.	89
- Conclusions.	91

3ème PARTIE : ECOLOGIE DES BACTERIES THERMOPHILES. 93

- Répartition des thermophiles et facteurs de répartition. 95
- Ecologie des groupements fonctionnels. 109
- Equilibre Thermophiles / Mésophiles telluriques. 124

4ème PARTIE : QUELQUES ASPECTS DE LA MORPHOLOGIE ET DE LA BIOLOGIE DES BACTERIES THERMOPHILES. 140

- Morphologie et caractères culturaux. 142
- Plurivalence fonctionnelle. 159
- Domaine thermique des bactéries thermophiles. .. 171
- Etude de la respiration. 176

5ème PARTIE : SUR L'ORIGINE DES MICROORGANISMES THERMOPHILES. 189

CONCLUSIONS GENERALES. 196

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE. 210

DEUXIEME THESE

(Proposition donnée par la Faculté)

LES CLASSIFICATIONS DES BACTERIES

-:-:-

VU

Le Doyen de la Faculté
des Sciences

signé : R. LAFFITTE.

et PERMIS d'IMPRIMER

, le 1er septembre 1962.

LE RECTEUR,

igné : H. GAUTHIER